

ESTADO DA ARTE DA FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* EM BOVINOS

Garcia¹, J.M., Avelino¹, K. B., Vantini¹, R.

¹DMVPRA, FCAV/UNESP-Jaboticabal

RESUMO

O desenvolvimento de novas biotecnologias tem permitido significativo aumento na produção animal, especialmente em bovinos. A múltipla ovulação e a transferência de embriões (MOET) tem sido usada com êxito há anos, para aumentar o potencial de exploração de vacas de genética superior. No entanto, não se tem verificado progresso no número de embriões de boa qualidade obtidos e destinados à transferência. Aliado a isso, sabe-se, também, que repetidas superovulações podem levar a problemas reprodutivos nas doadoras. Por outro lado, recentes avanços foram alcançados em outra técnica, a produção *in vitro* de embriões (PIV). A PIV, associada à aspiração folicular guiada por ultra-sonografia, tem sido usada comercialmente por algumas empresas, com resultados razoáveis. O principal objetivo da PIV comercial consiste na obtenção de embriões viáveis a partir de fêmeas que não estão mais aptas a produzirem descendentes pelas técnicas convencionais, como em vacas doadoras que apresentam infertilidade provocada por tratamento com gonadotrofinas ou por distúrbios/patologias no sistema reprodutor feminino. Fêmeas a partir dos seis meses de idade, gestantes até o terceiro mês ou no período pós-parto (2 a 3 semanas) podem ser usadas como doadoras para a PIV. Outra vantagem da aspiração folicular guiada por ultra-sonografia na PIV está no fato de que não é necessário o uso de hormônios para a recuperação de oócitos. Apesar dessas vantagens, estudos relacionados a maturação oocitária, cultivo embrionário e criopreservação ainda são necessários para a maximização dessa técnica e a produção de embriões de boa qualidade. Isto é de suma importância para a diminuição dos custos da PIV, tornando-a mais acessível aos produtores.

ABSTRACT

The development of new biotechnologies has enabled a significant increase in animal production, specially in cattle. Multiple ovulation and embryo transfer (MOET) have been successfully used for many years to increase the exploration potential of genetic superior cows. However, no progress has been seen to increase the number of good quality transferable embryos. It is also known that repeated superovulation can lead to reproductive problems in the donors. On the other hand, recent advancements of another technique, the *in vitro* embryo production (IVP), have been commercially applied by some companies, with reasonable results. The main purpose of commercial IVP is to obtain viable embryos from females that may not be able to produce descendants by conventional techniques, such as donor cows that present infertility caused by treatment of gonadotropins or by problems/pathologies in the female reproductive system. Females from 6 months of age, pregnant until the third month and also after calving (2-3 weeks) can be used as donors for IVP. Another advantage of ultrasound guided follicular aspiration in IVP is related to the fact that it is not necessary the use of hormones to recovery the oocytes. Despite of these advantages, studies related to oocyte maturation, embryo culture and cryopreservation are still necessary

aiming the maximization of this technique and the production of good quality embryos. This is specially important to decrease the costs of IVP and to become more available to the producers.

INTRODUÇÃO

Em contraste com os avanços verificados nos programas de seleção de touros, a influência genética da vaca nos programas de melhoramento de bovinos era limitada pelo baixo número de crias obtidas durante a vida reprodutiva da fêmea. Os estudos envolvendo dinâmica folicular, ciclo estral e sincronização da ovulação por meio de controle hormonal da função ovariana contribuíram para que a técnica de transferência de embriões (TE) tivesse êxito no aumento da produção de embriões e de descendentes. Dessa forma, pôde-se aumentar o potencial de exploração reprodutivo das fêmeas. Entretanto, as limitações impostas pela repetibilidade da TE associadas à resposta irregular aos tratamentos de superovulação, com alta variação no número de estruturas viáveis recuperadas pós-colheita, aliada à crescente demanda de embriões para fins de pesquisa, contribuíram para a investigação de outros caminhos voltados à produção de embriões em larga escala. O aprimoramento dos sistemas de produção *in vitro* (PIV) de embriões, na espécie bovina, a partir de oócitos recuperados de folículos de ovários de vacas abatidas, tem sido fundamental para o estudo e a compreensão de vários fenômenos e mecanismos biológicos que ocorrem durante o período desde a maturação dos oócitos, capacitação espermática e fertilização até o início do desenvolvimento embrionário em fase de pré-implantação. Os registros indicam que os primeiros estudos com maturação *in vitro* e subsequente fecundação, em bovinos, foram os de Iritani e Niwa (1977) relacionando a morfologia dos oócitos bovinos com a capacidade de maturar-se *in vitro*. Brackette *et al.* (1982) obtiveram o nascimento do primeiro bezerro produzido após fecundação *in vitro* de um oócito ovulado e Lu *et al.* (1987), o nascimento de gêmeos após maturação, fecundação e cultivo *in vitro*.

A obtenção de oócitos a partir de animais vivos, inicialmente realizada por laparoscopia e, mais recentemente, por meio da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrasonografia, adaptada da técnica desenvolvida para humanos por Pieterse *et al.* (1988) tornou possível a aplicação da técnica de PIV *in vivo* visando aumentar o aproveitamento do potencial genético das fêmeas consideradas superiores. O aprimoramento das condições de cultivo *in vitro* bem como das técnicas de recuperação de oócitos *in vivo* tornou viável a aplicação da PIV em escala comercial, sendo importante seu desenvolvimento dentro do atual contexto de incremento da produtividade na pecuária e pesquisa de novas biotecnologias. Apesar do incremento na produção *in vitro* de embriões, os resultados são muito variáveis de um laboratório para outro e até mesmo dentro de um mesmo laboratório. Além de variáveis como meio de cultivo, água, matéria-prima utilizada, temos ainda, o fator humano. São notórias as diferenças de resultados entre os indivíduos de um mesmo laboratório. Isto deixa bem claro que a produção *in vitro* de embriões é um processo artesanal. Um artesão, mesmo tendo as diretrizes para desenvolver um trabalho, tem a sensibilidade de realizá-lo de forma que o produto final seja uma obra-prima. Além de requisitos como ótima infraestrutura e excelente qualidade de matéria-prima, todo laboratório necessita de artesãos com conhecimento e sensibilidade para a produção *in vitro* de embriões.

PRINCIPAIS ETAPAS DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Em bovinos, além da busca pela compreensão dos eventos biológicos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário inicial, a PIV tem sido usada como um método alternativo ou complementar à TE, com o uso de oócitos imaturos recuperados de ovários de doadoras de várias idades e estado fisiológico-reprodutivo distintos. Após a recuperação dos oócitos, três passos biológicos que ocorrem *in vivo* são realizados em laboratório para a produção de embriões: maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos, (2) fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV).

a) Recuperação dos Oócitos

Para a produção *in vitro* de embriões, uma das técnicas mais utilizadas para a recuperação de oócitos é a aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-sonografia. Com o auxílio de um ultra-som e um transdutor acoplado a uma guia de aspiração, realiza-se a aspiração mediante introdução de uma agulha no interior dos folículos ovarianos. Um sistema de bomba a vácuo permite a recuperação dos oócitos e do líquido folicular para um tubo coletor. Realiza-se, em seguida, a procura e a seleção dos oócitos, em microscópio estereoscópico, de acordo com o número de camadas de células do *cumulus* e o aspecto do citoplasma do oócito. Os oócitos selecionados são, então, transportados até o laboratório, onde se inicia o processo de produção *in vitro* de embriões.

A aspiração folicular, em geral, não promove danos ao sistema reprodutor feminino, embora em alguns casos já tenha sido relatada a predominância de tecido conjuntivo no parênquima ovariano de vacas doadoras que estavam sendo submetidas a sessões de aspiração quinzenais (RODRIGUES & GARCIA, 2000).

Ao contrário da transferência de embriões, a aspiração folicular é considerada uma técnica que apresenta maior flexibilidade, uma vez que se pode obter oócitos de fêmeas a partir dos 6 meses de idade, de vacas prenhes até o terceiro mês de gestação, ou mesmo após o parto (2 a 3 semanas, segundo HASLER et al., 1995). A periodicidade das aspirações pode variar desde a realização de sessões esporádicas até regulares, a intervalos de duas semanas, durante várias semanas ou meses. Outra vantagem da realização da aspiração folicular em comparação à TE está ligada ao fato de que não é necessário o tratamento das doadoras com gonadotrofinas, o que é considerado benéfico especialmente em novilhas jovens, pois a estimulação hormonal pode provocar edema mamário e síndrome de ovário cístico. Além da possibilidade de desencadear casos de infertilidade, a superovulação, feita repetidas vezes, pode provocar ainda relaxamento dos ligamentos do úbere (GALLI et al., 2003).

b) Maturação *in Vitro* (MIV)

Os oócitos aspirados do interior dos folículos ovarianos não se encontram aptos a serem fecundados, sendo necessária uma série de transformações do núcleo e do citoplasma, que consistem na maturação oocitária. Em condições *in vivo*, a maturação tem início logo após o pico pré-ovulatório de LH enquanto que no caso da aspiração folicular, este processo se inicia com a remoção do oócito do interior do folículo ovariano. Em bovinos, são necessárias de 20 a 22 horas para que ocorra a maturação nuclear, com progressão do estágio de diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica para o estágio de metáfase II. As modificações citoplasmáticas estão relacionadas à reorganização das organelas citoplasmáticas, à migração dos grânulos corticais e às alterações dos padrões de síntese protéica, sendo que a transcrição de genes só voltará a ocorrer após a transição materno-zigótica. Além disso, ocorrem modificações nas células somáticas (células da granulosa tanto do *cumulus* como

murais) que envolvem o oócito durante o processo de maturação, atribuindo-se a estas células funções importantes na maturação nuclear e citoplasmática do oócito bem como na passagem de nutrientes e proteínas reguladoras através das junções tipo “gap”.

Para que todos os eventos da maturação oocitária ocorram *in vitro*, é necessário que os meios utilizados durante este período mimetizem as condições encontradas durante o processo de maturação *in vivo*. Existem vários métodos diferentes que podem ser utilizados e que já foram testados durante a maturação *in vitro* (MIV), em bovinos (revisão de NAGAI, 2001), sendo que a grande maioria dos laboratórios tem optado pela suplementação do meio de maturação com soro fetal bovino (SFB) e gonadotrofinas (FSH, LH e estradiol), em condições controladas de atmosfera e temperatura. Sabe-se que o potencial de desenvolvimento dos oócitos pós-maturação pode ser afetado por uma série de fatores, como osmolaridade, temperatura, pH, tensão de CO₂ e O₂ e uso de soro e células somáticas (HOLM & CALLESEN, 1998; NAGAI, 2001; HOSHI, 2003). Após o tempo de incubação da MIV, os oócitos completam a maturação com a extrusão do primeiro corpúsculo polar e estão prontos para a fecundação (em condições ideais, mais 90% dos oócitos estão em metáfase II após a MIV).

c) Fertilização *in Vitro* (FIV)

No processo de fertilização *in vitro* são usados espermatozóides de palhetas de sêmen congelado, e a separação em gradiente Percoll tem sido o método mais comum para a obtenção da fração espermática viva após a descongelação (GALLI & LAZZARI, 1996), embora outros sistemas possam ser usados, como o “swim-up”. Para se maximizar a capacidade fecundante do sêmen com o mínimo de polispermia possível, testes com diferentes concentrações espermáticas podem ser feitos, fixando-se alguns oócitos após a incubação com os espermatozóides e analisando-se em microscópio a configuração da cromatina. A partir destes resultados, determina-se a concentração de espermatozóides ideal para cada touro. Em geral, a concentração usada para a fertilização *in vitro* é de 2×10^6 espermatozóides/mL, calculada de acordo com a motilidade e a concentração da fração viva de espermatozóides obtida após a centrifugação em gradiente Percoll. O período de incubação dos oócitos com os espermatozóides varia entre 6 e 20 horas.

d) Cultivo *in Vitro* (CIV)

O cultivo *in vitro* corresponde à etapa de desenvolvimento do oócito fertilizado até o estágio de blastocisto. É durante este período de desenvolvimento pré-implantação que ocorrem eventos como ativação do genoma embrionário (transição materno-zigótica), divisão celular (clivagem), compactação dos blastômeros no estágio de mórula, início da diferenciação embrionária (células do trofoblasto, que darão origem à placenta e anexos fetais, e células da massa celular interna, que formarão o feto propriamente dito) com a formação da blastocle. Assim como nas etapas anteriores ao cultivo *in vitro*, diferentes protocolos têm sido usados durante esta fase de desenvolvimento embrionário. As condições de cultivo *in vitro* são consideradas muito importantes para que bons índices de produção de embriões sejam alcançados. Por essa razão, inúmeras pesquisas têm sido realizadas visando avaliar o efeito que diferentes fatores, intrínsecos e extrínsecos, podem exercer sobre o metabolismo e a capacidade de desenvolvimento destes embriões. Como exemplo, a composição dos meios de cultivo, as condições de temperatura e atmosfera gasosa, a adição de aminoácidos, vitaminas, macromoléculas e fatores de crescimento, assim como o uso de soro (GARDNER, 1998; MARQUANT-LEGUIENNE & HUMBLLOT, 1998; BAVISTER, 2000; THOMPSON,

2000). O co-cultivo com células do oviduto ou sobre monocamadas de células diferenciadas, como BRL ou células VERO, tem sido usado com êxito em alguns laboratórios (EYESTONE & FIRST, 1989; HASLER et al., 1995; CARNEGIE et al., 1997). Entretanto, este sistema quase não tem sido usado na produção em larga escala de embriões *in vitro* devido à sua baixa praticidade, uma vez que é necessário a manutenção e cultivo destas células em crescimento, estando sujeitas a variações biológicas que podem levar à produção de fatores que afetariam negativamente o desenvolvimento embrionário. Recentemente, a utilização de meios semi-definidos com pouco ou nenhum soro e baixa tensão de oxigênio tem substituído quase que totalmente o co-cultivo com células ou sobre monocamadas.

O desenvolvimento embrionário *in vitro* é avaliado no 6^o dia de cultivo visualizando-se a compactação dos blastômeros e início da formação da blastocela, sendo que no 7^o dia é feita a seleção e a avaliação final dos embriões para a transferência a fresco ou para a congelação.

GESTAÇÃO E NASCIMENTO A PARTIR DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*

As taxas de gestação de embriões produzidos *in vitro* podem ser bastante variáveis. Esta variação está relacionada à qualidade dos embriões, havendo interferência das condições de cultivo, dos meios usados durante todas as fases da PIV, da avaliação subjetiva e seleção dos embriões para a transferência, além do estado reprodutivo e nutricional das receptoras. Os índices de gestação aos 60 dias têm variado, em geral, entre 20 e 60%, de acordo com o sistema de produção *in vitro* usado pelos diferentes laboratórios.

Outro fator que tem limitado o uso da PIV é a distância entre o laboratório e local onde estão alojadas as receptoras, uma vez que, na grande maioria dos casos, realiza-se a transferência a fresco. Parece haver uma relação direta entre distância e tempo para a inovulação com relação à viabilidade dos embriões. Estes problemas de disponibilidade de grande número de receptoras e de distância poderiam ser amenizados caso os resultados de gestação a partir de embriões PIV congelados fossem melhores. A reduzida criotolerância dos embriões, dada pelo acúmulo de lipídeos, pode estar relacionada à presença do soro no meio de cultivo. A vitrificação poderia ser um método alternativo para diminuir as crioinjúrias provocadas sobre o embrião (VAJTA et al., 1998), entretanto, esta técnica ainda não tem sido adotada na prática comercial.

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 estar ligados ao momento do parto. Existem vários relatos descritos na literatura de prolongamento da gestação, distocia, aumento de mortalidade pré-natal e de peso corpóreo. Todas estas alterações fazem parte da “Síndrome da Cria Gigante” (LOS – “*Large Offspring Syndrome*”, revisão de YOUNG e al., 1998). Existem evidências de que a maioria destes casos está associados ao co-cultivo com células da granulosa ou sobre monocamadas de células BRL. Além disso, parece que altas concentrações de soro contribuem para o aumento da incidência destes distúrbios. Em programas comerciais, em condições mais controladas de desenvolvimento, utilizando-se tanto o cultivo *in vitro* como em oviduto de ovelhas, sem o uso de altas concentrações de soro ou BSA, existem relatos de que até 95% das gestações foram normais e de que a incidência da LOS foi reduzida (GALLI et al., 2001; NUMABE et al., 2000, VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000; SANGILD et al., 2000).

ESTADO DA ARTE

Qualquer processo de produção, por mais simples que seja, como a confecção de um bolo em uma confeitaria, segue uma conduta determinada, que requer a escolha dos ingredientes de melhor procedência, o modo de preparação da massa, o toque de tempero pessoal, a temperatura do forno e o momento exato de assado, que são habilidades particulares de cada mestre. Por outro lado, para ser um artesão é necessário possuir a capacidade de criar, inovar ou repetir tarefas com muita precisão. Desta mesma forma, os procedimentos para a produção *in vitro* de embriões bovinos já são bem definidos. Os meios de cultivo e os métodos empregados são muito similares entre os laboratórios, entretanto, os percentuais de produção de embriões, a qualidade dos mesmos e a capacidade em produzir gestação são variáveis de laboratório para laboratório e até mesmo entre indivíduos dentro de um mesmo laboratório. A capacitação em produzir embriões *in vitro* está ao alcance de todos que estão aptos para os trabalhos no laboratório. No entanto, as diferenças na sensibilidade de cada indivíduo, a dedicação e o amor à arte em fazer embriões *in vitro* são fundamentais para a constância e o sucesso de um laboratório.

Atualmente temos no país várias empresas que trabalham comercialmente com a PIV. Os resultados têm-se mostrado razoáveis, embora haja variação entre os laboratórios em decorrência de diferenças existentes em relação aos sistemas adotados de produção de embriões. Além disso, estas oscilações nas taxas de sucesso estão ligadas ao uso da PIV em situações distintas, aplicadas em diferentes categorias animais (bezerras, novilhas, vacas), idades (pré-púberes, pós-puerpério, vacas senis), raças, estado reprodutivo (ciclicidade normal, gestantes, pós-parto), frequência de aspiração (mensal, semanal, duas vezes ao mês) e administração de hormônios (FSH, BST).

A viabilidade econômica da técnica está intimamente relacionada à eficiência dos laboratórios, não apenas com relação à produção do maior número de embriões possível, mas, principalmente, com a qualidade do embrião em capacidade de estabelecimento de gestação, desenvolvimento fetal e placentário normais, obtenção de gestações a termo e nascimento de proles saudáveis e viáveis. Embora os custos da FIV ainda sejam superiores ao da TE, justifica-se seu emprego nos casos descritos anteriormente, como em fêmeas com distúrbios reprodutivos adquiridos que inviabilizam a reprodução e a produção de descendentes, condenando o animal a uma condição de infertilidade que, anteriormente ao surgimento da PIV, seria irreversível e sem solução. A PIV ainda permite o aumento do potencial de exploração zootécnica do animal em um menor período de tempo, uma vez que sessões de aspiração folicular podem ser realizadas a intervalos regulares de 15 dias sem prejuízo à vida reprodutiva da doadora. Realizada nesta periodicidade, ou mesmo mensalmente, com índices de produção de embriões acima de 40%, seu rendimento pode superar àquele alcançado com a TE, e a relação custo/benefício pode tornar-se justificável. Entretanto, ressalta-se que o objetivo da PIV não é substituir a técnica de TE, sendo indicado seu uso em casos de infertilidade, em animais que não respondem mais à superovulação ou nos quais não seja mais possível a recuperação de estruturas viáveis no momento da colheita dos embriões.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção *in vitro* de embriões, aliada à aspiração folicular guiada por ultrasonografia, permitiu aumentar o potencial de fêmeas de alto valor genético, bem como de animais portadores de infertilidade adquirida que estavam condenados ao abate por incapacidade de produzir descendentes. A perspectiva de aplicação em diversas outras situações, assim como a dependência que outras biotécnicas possuem ao uso dos sistemas de cultivo *in vitro*, como é o caso da clonagem, tem incentivado a realização de novas pesquisas envolvendo o aprimoramento da técnica e a compreensão dos mecanismos biológicos que ocorrem durante este período de pré-implantação, como metabolismo embrionário e expressão de genes importantes para as subseqüentes fases do desenvolvimento. A otimização da técnica, envolvendo a produção de embriões de boa qualidade e em número cada vez mais expressivo, associada à diminuição de alguns problemas que têm limitado seu uso em escala comercial, certamente contribuirá para o decréscimo do custo operacional da PIV, que ainda é alto em decorrência dos materiais e equipamentos utilizados, o que possibilitará a difusão desta tecnologia visando ao aumento da produtividade da pecuária nacional.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer o apoio financeiro que a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) tem dado às suas pesquisas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVELINO, K.B. *Efeitos de fontes energéticas, antioxidantes e atmosfera gasosa, em meio quimicamente semi-definido no desenvolvimento de embriões bovinos de duas células até blastocisto expandido*. Jaboticabal: FCAV-UNESP, 2000. 70p. Dissertação (Mestrado).
- AVELINO, K.B., VANTINI, E., SENEDA, M.M., et al., *In vitro* production of embryos of cows with acquired infertility. *Theriogenology*, v.57, p.656, 2002.
- BAVISTER, B.D. Interactions between embryos and the culture milieu. *Theriogenology*, v.53, p.619-626, 2000.
- BRACKETT, R.G., BOUSQUET, D., BOICE, M.L., DONAWICK, W.J., EVANS, J.F., DRESSEL, M.A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*. V.27, p. 147-158, 1982.
- CARNEGIE, J.A., DURNFORD, R., ALGIRE, J., et al., Evaluation of mitomycin-treated vero cells as a co-culture system for IVM-IVF derived bovine embryos. *Theriogenology*, v.48, p.377-389, 1997.
- EYESTONE, W.H., FIRST, N.L. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.*, v.85, p.715-720, 1989.
- GALLI, C., CROTTI, G., NOTARI, C., et al., Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, v.55, p. 1341-1357, 2001.
- GALLI, C., DUCHI, R., CROTTI, G., et al., Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, v.59, p.599-616, 2003.
- GARDNER, D.K. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology*, v.49, p.83-102, 1998.
- HASLER, J.F., HENDERSON, W.B., HURTTGEN, P.J., et al., Production freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, v.43, p.141-152, 1995.
- HOLM, P., CALLESEN, H. *In vivo* versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod. Nutr. Dev.*, v.38, p.579-594, 1998.

- HOSHI, H. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology*, v.59, p.675-685, 2003.
- IRITANI, A., NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *J. of Reprod. Fertility*. V. 50, p. 119-121, 1977.
- LU, K.H., GORDON, I., GALLAGHER, M., McGOVERN, H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived *In vitro* fertilization of follicular oocytes matured *in vitro*. *Veterinary record*. V. 121, p. 159-260, 1987.
- MARQUANT-LEGUIENNE, B., HUMBLLOT, P. Practical measures to improve *in vitro* blastocyst production in the bovine. *Theriogenology*, v.49, p.3-11, 1998.
- NAGAI, T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*, v.55, p.1291-1301, 2001.
- NUMABE, T., OIKAWA, T., KIKUCHI, T., et al., 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.
- PIETERSE, M.C., KAPPEN, K.A., KRUIP, Th. A.M., TAVERNE, M.A.M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*. V. 30, p. 751-762, 1988.
- RODRIGUES, C.F.M., GARCIA, J.M. Fecundação *in vitro* em bovinos: aplicação comercial. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.28, p.186-187, 2000 (Supl.)
- SANGILD, P.T., SCHMIDT, M., JACOBSEN, H., et al., Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from *in vitro* produced bovine embryos. *Biol. Reprod.*, v.62, p.1495-1504, 2000.
- SENEDA, M.M. *Aspectos técnicos e biológicos da obtenção in vivo de oócitos bovinos*. Jaboticabal: FCAV-UNESP, 2001. 76p. Tese (Doutorado).
- THOMPSON, J.G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.263-275, 2000.
- YOUNG, L.E., SINCLAIR, K.D., WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.*, v.3, p.155-163, 1998.
- VAJTA, G., KUGAYAMA, M., HOLM, P., et al., A new way to avoid cryoinjuries of mammalian ova and embryos: the OPS vitrification. *Mol. Reprod. Dev.*, v.51, p.53-58, 1998.
- VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M., MULLAART, E., DE ROOS, A.P.W., et al., Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology*, v.53, p.575-597, 2000.