



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UnICEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

JOSÉ MARIA CAVALCANTE ANDRADE
ELIZA ENOIA DE REZENDE TEIXEIRA

**INJEÇÃO INTRA-FOLICULAR DE OVÓCITOS IMATUROS EM BOVINOS: INFLUÊNCIA DA
INJEÇÃO INTRA-FOLICULAR NO MOMENTO DA OVULAÇÃO**

BRASÍLIA
2020



JOSÉ MARIA CAVALCANTE ANDRADE

ELIZA ENOIA DE REZENDE TEIXEIRA

**INJEÇÃO INTRA-FOLICULAR DE OVÓCITOS IMATUROS EM BOVINOS: INFLUÊNCIA DA
INJEÇÃO INTRA-FOLICULAR NO MOMENTO DA OVULAÇÃO**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Orientador: Prof. Dr. Andrei Antonioni Guedes Fidelis

BRASÍLIA

2020

AGRADECIMENTOS

Ao professor orientador, Dr. Andrei Antonioni Guedes Fidelis, pelo empenho e apoio dedicado à elaboração desta pesquisa científica.

Aos pesquisadores Otávio Augusto Costa de Faria e Luzia Renata Oliveira Dias pelo apoio e assistência na evolução desta pesquisa.

A Dr^a Margot Alves Nunes Dode pelos ensinamentos e pela oportunidade conferida.

Ao aluno Bruno Oliveira pelo auxílio e contribuição para com a realização da pesquisa.

E a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo espaço e animais cedidos ao experimento.

RESUMO

A transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) surgiu, de forma inovadora, para a produção de embriões bovinos, por ser uma biotecnologia por associar os benefícios da produção *in vivo* e *in vitro*. O presente estudo objetivou analisar a influência da injeção intrafolicular no folículo dominante das vacas ovuladoras sobre o momento da ovulação. Os animais foram submetidos a um protocolo de sincronização de estro, com a obtenção de um folículo dominante pré-ovulatório. Três grupos experimentais foram formados, com quatorze animais nos grupos “Controle” e “Injeção + ovócito”, e dez animais no grupo “Injeção”. O primeiro grupo (Controle) foi submetido apenas ao protocolo hormonal. O segundo grupo (Injeção), além do protocolo hormonal, foi submetido também a injeção intra-folicular. E o terceiro grupo (Injeção+ovócito) passou pelo mesmo processo descrito no grupo “injeção”, entretanto, foram injetados ovócitos imaturos, provenientes de ovários de abatedouro, para seu folículo por meio de injeção no folículo dominante. Para avaliar a influência da injeção no momento da ovulação, todos os animais foram submetidos à uma avaliação ultrassonográfica transretal após 22 horas da aplicação do GnRH, de hora em hora, até a ovulação propriamente dita. Os parâmetros analisados foram submetidos ao teste de ANOVA, com 5% de significância. Não houve diferença estatística ($p>0,05$) da injeção intrafolicular de ovócitos imaturos no momento da ovulação ($30,7 \pm 2,0$) quando comparado ao momento de ovulação dos animais do primeiro grupo ($30,9 \pm 1,6$) e segundo grupo ($30,7 \pm 2,5$). O protocolo de sincronização de estro das ovuladoras pode ser mantido.

Palavras-Chave: Embrião *in vivo*. Injeção intrafolicular. Ovulação.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	7
3. METODOLOGIA.....	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	15
REFERÊNCIAS	16

1. INTRODUÇÃO

A demanda pelo emprego de técnicas de reprodução assistida em bovinos aumenta gradativamente devido a busca pela multiplicação acelerada e eficiente de animais que expressam características econômicas importantes. Dentre essas técnicas, a produção de embriões *in vivo* por superestimulação ovariana (SOV) e a produção de embriões *in vitro* (PIVE) são as opções mais acessíveis para esta multiplicação.

Entretanto, tais técnicas possuem particularidades negativas, como: obedecer a um intervalo de aproximadamente 40 dias entre os protocolos hormonais na SOV, e a demanda por estruturas laboratoriais e meios de cultura complexos na PIVE. Diante desta realidade, Sprícigo *et al.*, (2016) relatou recentemente, pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, a técnica de transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI), que consiste na transferência de ovócitos imaturos para o folículo pré-ovulatório.

A TIFOI surgiu então como uma terceira opção para a produção de embriões bovinos, por associar a aspiração folicular orientada por ultrassonografia (OPU), utilizada na PIVE, e as vantagens da produção *in vivo*. Trata-se de uma tecnologia vantajosa para o mercado agropecuário devido à dispensabilidade do uso de hormônios para a estimulação de múltiplas ovulações; melhor qualidade de embriões devido a produção ser totalmente *in vivo*; a viabilidade da doadora e a isenção da necessidade de meios de cultivo complexos, equipamentos e estruturas laboratoriais (Sprícigo e Dode, 2017).

Entretanto, concomitantemente às vantagens descritas, Sprícigo *et al.* (2016) relatou uma menor eficiência da TIFOI quando comparada com os procedimentos de produção de embriões *in vitro*. Diante disso, faz-se necessário a realização de mais estudos com o objetivo de aumentar a eficiência e a aplicabilidade desta técnica nos programas de reprodução animal.

Frente a tais circunstâncias, objetivou-se com o presente estudo analisar a influência da injeção intra-folicular no folículo dominante das vacas ovuladoras sobre o momento da ovulação e identificar o momento da ovulação em vacas submetidas às injeções em seus folículos dominantes com o auxílio da ultrassonografia.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A produção animal se tornou uma atividade extrativista no século XX, e deixou de ser considerada uma prática apenas de subsistência. Houve uma demanda gradual por animais que apresentassem um melhor desempenho e que fossem mais adaptados às diversas condições ambientais. Diante disso, iniciaram-se os programas de melhoramento genético que buscaram a otimização dos índices de produtividade e da eficiência reprodutiva a fim de suprir a demanda populacional pelos alimentos de origem animal (COUTINHO, DO ROSÁRIO E JORGE, 2010).

O uso das técnicas de reprodução assistida é comum em programas de melhoramento genético para disseminar, de uma maneira rápida e eficiente, animais geneticamente superiores que expressam características econômicas importantes. Entre essas técnicas, a produção *in vivo* de embriões com superestimulação ovariana pelo uso de hormônios (SOV-TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) associada à aspiração folicular por ultrassonografia (OPU) são atualmente as opções disponíveis para otimizar o uso do genótipo das fêmeas.

No Brasil, os primeiros registros de transferência de embriões produzidos *in vivo* efetuaram-se na década de 1980 e, no final da década de 1990, o mercado de produção e transferência de embriões bovinos já havia se consolidado (RUBIN, 2005 *apud* VIANA *et al.*, 2018).

Considerado como o maior produtor de embriões bovinos *in vitro*, em 2007 o Brasil foi responsável por 48% do total mundial, com destaque às raças zebuínas de corte, que representavam 99,3% do total dos embriões PIVE (VIANA *et al.*, 2018).

De acordo com Viana (2018), o marco histórico foi no ano de 2017, onde foi registrado pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS) a transcendência do total de embriões PIVE frente àqueles gerados *in vivo*: 992.289 e 406.287, respectivamente. Esta consolidação se deu não mais apenas por embriões produzidos em raças zebuínas de corte, mas também nos demais segmentos: taurinos e zebuínos, leite e corte.

As metodologias disponíveis (SOV-TE e PIVE) são capazes de aumentar a quantidade de bezerro/vaca/ano, porém, peculiaridades em cada técnica conferem vantagens e desvantagens a ambas. Enquanto a SOV é, em teoria, capaz de produzir um embrião de melhor qualidade, ela gera uma alteração hormonal, em decorrência da utilização do hormônio foliculo estimulante (FSH). Motivo pelo qual um intervalo de 40 a 60 dias entre

protocolos deve ser respeitado. Em contrapartida, a PIVE é uma opção interessante, pois a doadora pode ser submetida à OPU, quando respeitados os cuidados com a técnica, duas vezes por semana. Porém, os ovócitos obtidos devem passar pelos processos de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. Durante esses processos os ovócitos e zigotos estão sujeitos aos efeitos negativos do sistema *in vitro*, o que resulta em embriões de pior qualidade, comparado aos produzidos *in vivo* (SUDANO *et al.*, 2012).

Para superar as limitações do cultivo *in vitro*, vários métodos experimentais *in vivo* ou *in vitro*, têm sido investigados. O papel crucial das tubas uterinas para o desenvolvimento precoce do embrião já está bem estabelecido (BESENFELDER *et al.*, 2012). Para a comprovação disto, tubas uterinas de camundongos (RIZOS *et al.*, 2007), coelhos e ovelhas (RIZOS *et al.*, 2002) já foram utilizadas para o cultivo embrionário a partir de zigotos obtidos *in vitro* para a melhorar a qualidade dos embriões. De fato, quando os embriões são cultivados totalmente *in vitro* a qualidade é inferior quando comparados aos embriões cultivados em sistemas mistos, maturação e fecundação *in vitro* e cultivo *in vivo* (RIZOS *et al.*, 2002).

Modificações e reorganizações de organelas, além do avanço da meiose para o estágio de metáfase II, caracterizam a maturação ovocitária. Estes eventos podem ser influenciados pelo sistema e pelas condições de cultivo dos complexos *cumulus* CCOs (WARZYCH *et al.*, 2007).

As condições de cultivo comumente utilizadas para a maturação e cultivo *in vitro* envolvem o uso de soro fetal bovino (SFB) e alta tensão de oxigênio. Por sua vez, o SFB possui compostos indefinidos e aliado a altas tensões de O₂, quando utilizado no cultivo embrionário ou maturação ovocitária, pode alterar as características dos ovócitos e embriões (RIZOS *et al.*, 2002).

Resultados prévios mostraram que apesar de ser possível ter um incremento na produção de blastocisto (50%) com a utilização de ovócitos maturados *in vitro*, a maturação *in vivo* é capaz de aumentar os índices de desenvolvimento embrionário cerca de 15%, alcançando os 65% (SPRÍCIGO *et al.*, 2015).

Uma associação dos benefícios da produção *in vivo*, com embrião de melhor qualidade, e da produção *in vitro*, com menor desgaste e ausência de resíduos hormonais na doadora e maior quantidade de embriões, seria, portanto, a opção ideal para a produção de embriões de alta qualidade e baixo custo (SPRÍCIGO *et al.*, 2016)

A injeção de ovócitos imaturos em um folículo prestes a ovular é uma proposta para atender esses requisitos. A ideia dessa técnica é que vários ovócitos imaturos obtidos por OPU possam ser de uma doadora, possam ser injetados em um folículo dominante de uma receptora, onde passariam por todo o processo fisiológico de maturação, liberação durante a ovulação, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial *in vivo*. A receptora dos ovócitos seria submetida a um protocolo convencional de indução do estro, que após a injeção dos ovócitos em seu folículo dominante seria inseminada, abrigando os embriões até o dia em que seriam coletados e transferidos para receptoras definitivas (SPRÍCIGO E DODE, 2017).

A ovulação, um dos eventos do ciclo ovariano, ocorre quando há o pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH). Este, induz a retomada da meiose e a maturação do ovócito por meio de mudanças nos níveis de adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico (AMPC) e ativação do fator promotor da meiose (MPF) (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

Inicialmente, antes do rompimento da vesícula germinativa, o LH induz um pico transitório de AMPC, o qual leva a diminuição nos níveis de guanosina monofosfatada cíclica (GMPc), que promove a diminuição do efeito inibitório da fosfatidilesterase 3ª (PDE3A). Tal liberação, leva a uma diminuição da concentração de AMPC, fato essencial para a defosforilação da proteína quinase A (PKA) e ativação do MPF, responsável pela retomada da meiose (NORRIS *et al.*, 2009; VACCARI *et al.*, 2009; SPRÍCIGO E DODE, 2017).

Os CCOs ovócitos perdem a ação do GMPc folicular quando retirados do ambiente folicular durante a OPU, o que leva a uma rápida ativação do PDE3A do ovócito e ao decréscimo dos níveis de AMPC, o que induz a ativação da PKA e retomada espontânea da meiose (TRIPATHI, KUMAR E CHAUBE, 2010). Neste contexto, o período da coleta dos ovócitos é imprescindível para o sucesso da maturação (SPRÍCIGO E DODE, 2018).

Para que os níveis de AMPC não diminuam levando a inativação da PKA, os CCOs devem receber nutrientes e fatores que inibam a ativação da PDE. Deste modo, todo o processo da TIFOI (coleta, seleção e transferência intrafolicular) deve ser realizado em líquido folicular, o qual possui os nutrientes necessários para inibir a PDE e evitar a retomada da meiose (GILCHRIST *et al.*, 2016).

O primeiro relato de transferência intra-folicular de ovócitos para um folículo pré-ovulatório de uma receptora intermediária foi realizado em éguas por Fleming e

colaboradores em 1985 (FLEMING E KUEHL, 1985). Estes mesmos autores relataram o primeiro embrião produzido em bovinos, utilizando a técnica de injeção intra-folicular com ovócitos. Enquanto Fleming e seus colegas tiveram acesso aos ovários por uma incisão flanco, Hinrichs e DiGiorgio foram os primeiros a adaptarem essa técnica a equinos (HINRICHS *et al.*, 1991). Esses autores utilizaram um trocater e uma cânula na parede abdominal na área do flanco, que permitiu a passagem de uma agulha, através da cânula, para perfurar a parede exterior do folículo (HINRICHS *et al.*, 1991). Após esse relato, a técnica foi melhorada e passou a ser realizado com o auxílio de um ultrassom transvaginal em equinos (GOUDET *et al.*, 1997), bovinos (BERGFELT *et al.*, 1998) e humanos (WERNER-VON DER BURG *et al.*, 1993).

A TIFOI foi realizada por Sprícigo *et al.* (2016) e desta, todas as gestações detectadas vieram a termo com o nascimento de 4 bezerros dos quais um foi originado do ovócito da ovuladora identificado por teste de paternidade através de exames de DNA. Deste modo, é comprovado que tal técnica é capaz de produzir embriões viáveis e bezerros saudáveis.

Entretanto, a eficiência desta técnica ainda precisa ser melhorada, e um dos processos a ser explorado é a sincronização do estro da ovuladora, onde Sprícigo e Dode (2018) afirmam que a utilização de diferentes protocolos pode ser aplicada, entretanto necessita-se de novas avaliações com o acompanhamento do momento da ovulação. Isto posto, após a comprovação da funcionalidade da técnica, faz-se necessário seu desenvolvimento de forma mais eficiente.

3. METODOLOGIA

Para a realização do experimento, foram utilizadas 38 vacas da raça nelore, com média de 450kg e idade entre três e quatro anos. Estas foram mantidas a pasto e com fornecimento de água *ad libitum*.

Os animais foram submetidos a um protocolo de sincronização do ciclo estral no qual objetivou-se a indução do animal ao estro, com a obtenção de um folículo dominante pré-ovulatório. Iniciou-se o protocolo no dia -10 (D-10), com a inserção do implante de progesterona (Primer Tecnopec, São Paulo, Brasil) associado à aplicação (i.m.) de 2mg de Benzoato de Estradiol (RIC-BE, Brasil). No dia -2, foram aplicados 2 ml (i.m.) de Prostaglandina F2a (0,150 mg de d- Cloprostenol) (Prolise ARSA S.R.L, Argentina) juntamente com a remoção do implante de progesterona, e no dia -1, foi administrado 1 mg de Benzoato de Estradiol (i.m.). No dia D0 administrou-se um análogo do GnRH (Gestran®, Tecnopec, São Paulo, Brasil) às 52 horas após a remoção da P4, como indutor de ovulação.

A partir desse momento, três grupos experimentais foram formados, com quatorze animais nos grupos “Controle” e “Injeção + ovócito”, e dez animais no grupo “Injeção”. O primeiro grupo (Controle) foi submetido apenas ao protocolo hormonal. O segundo grupo (Injeção), além do protocolo hormonal, foi submetido também a injeção intra-folicular, porém sem a introdução de ovócitos neste folículo. Já o terceiro grupo (Injeção+ovócito) passou pelo mesmo processo descrito no grupo “injeção”, entretanto, foram injetados ovócitos imaturos, provenientes de ovários de abatedouro, para seu folículo por meio de injeção no folículo dominante.

Para a injeção nos grupos (injeção e Injeção + ovócitos), os animais foram contidos em tronco de contenção bovino, e após a antisepsia local realizou-se a anestesia epidural baixa com lidocaína 2% (Anestésico L Pearson, Eurofarma, Brasil). Utilizou-se uma guia transvaginal (WTA, Brasil), contendo um transdutor de ultrassom convexo de 7,5 MHz (Mindray, USA). Na guia transvaginal um mandril foi acoplado, montado com um sistema fechado, contendo em uma das extremidades uma seringa de insulina e na outra extremidade uma agulha 27 G. Os CCOs imaturos foram alocados por pressão negativa, dentro da agulha junto ao líquido folicular, num volume final de 60 µL. Todo o sistema foi preenchido por PBS. A guia foi então posicionada no fórnix vaginal e direcionada para

o mesmo lado do ovário contendo o folículo dominante. A agulha perfurou o fórnix e a parede do folículo e logo após injetou-se todo o volume da agulha, contendo os CCOs.

Para avaliar a influência da injeção no momento da ovulação, todos os animais foram submetidos à uma avaliação da ovulação, a cada 6 horas, por meio de avaliação ultrassonográfica transretal e, após 22 horas da aplicação do GnRH, foram avaliados de hora em hora, até a ovulação propriamente dita.

Para a avaliação estatística dos dados obtidos, utilizou-se o programa “Prism Graphpad 6.0”. Os parâmetros analisados foram submetidos ao teste de ANOVA, com 5% de significância), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através deste experimento, como exposto na tabela 1, não foi observado, por meio da avaliação do tempo de ovulação pós indução com GnRH, influência da injeção intrafolicular de ovócitos imaturos no momento da ovulação quando comparado ao momento de ovulação dos animais dos grupos “controle” e “injeção com líquido folicular (LF)”.

Tabela 1: Efeito da injeção de TIFOI no momento da ovulação e no diâmetro folicular.

	Número de Animais	Tempo de ovulação pós indução (horas)	Diâmetro folicular 0h(mm)*	Diâmetro folicular ovulação (mm)**
Controle	14	30,9 ± 1,6 ^a	11,1 ± 1,2 ^a	10,7 ± 1,7 ^a
Injeção LF	10	30,7 ± 2,5 ^a	11,6 ± 1,1 ^a	9,7 ± 2,1 ^{ab}
Injeção + Ovócitos	14	30,7 ± 2,0 ^a	12,1 ± 1,5 ^a	8,7 ± 1,2 ^b

Letras distintas entre valores na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de ANOVA.

*Momento 0h: Avaliação feita no momento da aplicação de GnRH.

**Avaliação feita duas horas antes da constatação da ovulação

A injeção intrafolicular interferiu no diâmetro folicular, mensurado antes da injeção e momentos antes da ovulação, nos grupos “injeção com LF” e “Injeção + Ovócito” (tabela 1). Entretanto, não afetou o momento da ovulação destes grupos, que ocorreu próximo ao momento de ovulação do grupo “controle”.

A redução no diâmetro folicular dos grupos que receberam a injeção pode ter ocorrido devido ao acréscimo de volume no interior do folículo, proveniente da adição de conteúdo (líquido folicular ou líquido folicular com ovócitos) uma vez que não se tem bem estabelecido para esta técnica a quantidade de ovócitos adequada a ser injetada (SPRÍCIGO E DODE, 2017). Diante disso, pode-se inferir que, da mesma forma, não se conhece o volume adequado de líquido folicular a ser inserido nos folículos. Uma quantidade muito alta poderá levar a um aumento excessivo da pressão interna na estrutura, ocasionará um maior extravasamento de líquido através do orifício formado a partir da injeção folicular.

Diante dos dados obtidos e das avaliações estatísticas constatou-se que o protocolo de sincronização do estro da ovuladora (-10 [D-10], inserção do implante de progesterona associado à aplicação [i.m.] de 2mg de Benzoato de Estradiol; No dia -2, aplicação de 2 ml [i.m.] de Prostaglandina F2a juntamente com a remoção do implante de progesterona, e no dia -1, administração de 1 mg de Benzoato de Estradiol [i.m.]; No dia

DO, aplicação de um análogo do GnRH às 52 horas após a remoção da P4, como indutor de ovulação) pode ser mantido, tendo em vista que não houve alteração no momento da ovulação daqueles animais que foram submetidos à injeção intrafolicular de líquido folicular e de ovócitos imaturos, comparado ao grupo controle, no qual não houve manipulação ovariana.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A TIFOI é uma tecnologia com competência para ser uma terceira opção no mercado de produção de embriões bovinos. O alcance à fundamentação da sistematização da técnica é notório, tendo em vista que o protocolo de sincronização de estro das ovuladoras foi estabelecido por meio deste estudo.

Resultados satisfatórios ainda precisam ser alcançados e, visto que os índices ainda não são convincentes. Portanto, faz-se necessário a investigação da qualidade dos ovócitos e, por conseguinte, dos embriões pós injeção intrafolicular, entre outras alterações que esta injeção pode causar a nível estrutural e fisiológico.

REFERÊNCIAS

- BERGFELT, D. R.; BROGLIATTI, G. M.; ADAMS, G. P. **Gamete recovery and follicular transfer (graft) using transvaginal ultrasonography in cattle.** *Theriogenology*, 50, p. 15-25, 1998.
- BESENFELDER, U.; HAVLICEK, V.; BREM, G. **Role of the oviduct in early embryo development.** *Reprod Domest Anim*, 47 Suppl 4, p. 156-163, 2012.
- COUTINHO, L. L., DO ROSÁRIO, M. F., JORGE, E. C. **Biotecnologia Animal.** *Estudos Avançados* 24 (70) p. 123-147, 2010.
- DELEUZE, S.; GOUDET, G.; CAILLAUD, M.; LAHUEC, C.; DUCHAMP, G. **Efficiency of embryonic development after intrafollicular and intraoviductal transfer of *in vitro* and *in vivo* matured horse oocytes.** *Theriogenology*, 72, p. 203-209, 2009.
- FLEMING, A.D. SR; KUEHL, T. J. **Maturation of baboon or cow oocytes transplanted into a surrogate.** *Theriogenology*, 23, p. 192, 1985.
- GILCHRIST, R. B.; LUCIANO, A. M.; RICHANI, D.; ZENG, H. T.; WANG, X.; VOS, M. D., SUGIMURA, S.; SMITZ, J.; RICHARD, F. J.; THOMPSON, J. G. **Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides.** *Reproduction*, v.152, p.143-157, 2016.
- GOUDET, G.; BEZARD, J.; DUCHAMP, G.; PALMER, E. **Transfer of immature oocytes to a preovulatory follicle: an alternative to *in vitro* maturation in the mare?** *Equine Vet J Suppl.* 54-59, 1997.
- HINRICHS, K.; DIGIORGIO, L. M. **Embryonic development after intra-follicular transfer of horse oocytes.** *J Reprod Fertil Suppl*, 44, p. 369-374, 1991.
- NORRIS, R. P.; RATZAN, W. J.; FREUDZON, M.; MEHLMANN, L. M.; KRALL, J.; MOVSESIAN, M. A.; WANG, H.; KE, H.; NIKOLAEV, V. O.; JAFFE, L. A. **Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte.** *Development*, v.136, p.1869-1878, 2009.
- VIANA, J. H. M., FIGUEIREDO, A. C. S., GONÇALVES, R. L. R., SIQUEIRA, L. G. B. **A historical perspective of embryo-related Technologies in South America.** *Proceedings of the 10th International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS 2018); Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 2018.*
- RIZOS, D.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A. **Development and pattern of mRNA relative abundance of bovine embryos cultured in the isolated mouse oviduct in organ culture.** *Mol Reprod Dev*, 74, p. 716-723, 2007.
- RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. **Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality.** *Mol Reprod Dev*, 61, p. 234- 248, 2002.

RUBIN, M. I. B. **Twenty years history of the Brazilian Embryo Technology Society (1985-2005)**. *Acta Sci Vet*, 33:35-54, 2005.

SPRÍCIGO, J. F.; DIOGENES, M. N.; LEME, L. O.; GUIMARAES, A. L.; MUTERLLE, C. V.; SILVA, B. D.; SOLA-ORIOLO, D.; PIVATO, I.; SILVA, L. P.; DODE, M. A. **Effects of Different Maturation Systems on Bovine Oocyte Quality, Plasma Membrane Phospholipid Composition and Resistance to Vitrification and Warming**. *PLoS One*, 10, p. e0130164, 2015.

SPRÍCIGO, J. F. W.; DODE, M. A. N. **Transferência intra-folicular de ovócitos imaturos (TIFOI) em bovinos**. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* v.41, n.1, p.25-32, 2017.

SUDANO, M. J.; SANTOS, V. G.; TATA, A.; FERREIRA, C. R.; PASCHOAL, D. M.; MACHADO, R.; BURATINI, J.; EBERLIN, M. N.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. **Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* *in vitro*- and *in vivo*-produced blastocysts**. *Biol Reprod*, 87, p. 130, 2012.

TRIPATHI A.; KUMAR, K. V.; CHAUBE, S. K. **Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes**. *J Cell Physiol*, v.223, p.592-600, 2010.

VACCARI, S.; WEEKS, J. L. 2nd; HSIEH, M.; MENNITI, F. S.; CONTI, M. **Cyclic GMP Signaling Is Involved in the Luteinizing Hormone-Dependent Meiotic Maturation of Mouse Oocytes**. *Biology of Reproduction*, v.81, p.595–604, 2009.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO J. **Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles**. *Theriogenology*, v.63, p.1717-1751, 2005.

WARZYCH, E.; WRENZYCKI, C.; PEIPPO, J.; LECHNIAK, D. **Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced *in vitro***. *Mol Reprod Dev*, 74, p. 280-289, 2007.

WERNER-VON DER BURG, W.; COORDES, I.; HATZMANN, W. **Pregnancy following intrafollicular gamete transfer**. *Hum Reprod*, 8, p. 771-774, 1993.