

*Artículo de revisión*

## MÉTODOS PARA DETERMINAR A QUALIDADE DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*

### Methods to evaluate the quality of *in vitro* produced embryos

M.A.N. Dode<sup>1</sup>; J.O. Carvalho<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil-

<sup>2</sup> Departamento de Produção Animal ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba SP, Brasil

**Autor correspondente:** Margot Alves Nunes Dode. Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, [margot.dode@embrapa.br](mailto:margot.dode@embrapa.br)

Endereço: Parque Estação Biológica, Final Av. W5/N, Prédio PBI, 70770-917, Brasília- DF, Brasil

#### RESUMO

A seleção mais acurada de embriões tem sido uma preocupação desde que produção *in vitro* (PIV) foi estabelecida, sendo a morfologia ainda o único método utilizado na prática para essa avaliação. Vários procedimentos focando os diversos aspectos e estruturas dos embriões, além da morfologia embrionária em D7, foram desenvolvidos e têm sido utilizados na tentativa de se estabelecer um sistema/método de seleção mais eficiente. Essa revisão visa apresentar os métodos disponíveis para avaliar a qualidade de embriões PIV, incluindo métodos invasivos e não invasivos, métodos utilizados na rotina, e procedimentos que ainda estão em fase de estudo. Serão apresentadas os procedimentos mais relevantes incluindo determinação do número de células, cinética de desenvolvimento, desenvolvimento pós-eclosão, transcriptoma e metaboloma.

Palavras-chave: *qualidade, seleção embrionária, expressão gênica, metabolismo, cinética*

#### ABSTRACT

Embryo selection has been an important concern since *in vitro* embryo production (IVP) was established, being morphology the most used criterion to select bovine IVP embryos. A variety of procedures focusing on other aspects of embryo, besides the morphology on D7, have been developed. Those procedures have been used to establish a system that enables to identify embryos with high potential for successful pregnancy. This review aims to summarize the main methods available to evaluate IVP embryos including invasive and non-invasive procedures, methods that are using routinely as well as those that still being developed. Here it will be described different strategies to evaluate embryos cell number, morphokinetics, post-hatching development, transcriptome and metabolomics.

Key words: *viability, embryo selection, gene expression, kinetics, metabolism*

## INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões de mamíferos domésticos é uma biotécnica utilizada como alternativa que permite um maior aproveitamento de animais de interesse acelerando a sua multiplicação. Apesar dos avanços obtidos nos últimos anos, os índices de prenhez em bovinos ainda são inferiores para embriões PIV do que para os produzidos *in vivo*, o que causa um aumento no custo desta biotécnica (Pontes *et al.*, 2009; Pontes *et al.*, 2011). Esses índices se devem, provavelmente, à menor qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro* (Hasler *et al.*, 1995; Concoran *et al.*, 2006. Hansen *et al.*, 2010) associada a incapacidade de se selecionar e transferir apenas os embriões com maior potencial de gerar uma prenhez. Portanto, a avaliação da qualidade do embrião é um fator determinante para o sucesso da PIV, pois a seleção e transferência daqueles de melhor qualidade aumenta a taxa de prenhez, melhorando o aproveitamento de receptoras e reduzindo os custos.

Até o presente a seleção de embriões PIV é realizada pela avaliação visual da morfologia, que apesar de ser um indicador de qualidade, pouco nos diz sobre capacidade de um embrião PIV de iniciar uma gestação (Pontes *et al.*, 2009; Pontes *et al.*, 2011; Mamo *et al.*, 2011). Vários procedimentos focando os diversos aspectos e estruturas dos embriões, além da morfologia embrionária em D7, foram desenvolvidos e têm sido utilizados na tentativa de se estabelecer um sistema/método de seleção mais eficiente. Essa revisão tem por objetivo apresentar os métodos disponíveis para avaliar a qualidade de embriões PIV, incluindo métodos invasivos e não invasivos, métodos utilizados atualmente na rotina, e procedimentos que ainda estão em fase de estudo.

### *Morfologia*

A avaliação visual da morfologia sob estereomicroscópio ainda é o método mais

utilizado para indicar a qualidade dos embriões PIV. Em bovinos essa avaliação é feita, em geral, no dia 7 de desenvolvimento (D7) e, mais raramente no dia 8 (D8), sendo os embriões classificados em Blastocisto inicial (Bi), Blastocisto (Bl), Blastocisto expandido (Be), Blastocisto em eclosão (Bn) e Blastocisto eclodido (Be), conforme preconizado pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS; Stringfellow e Seidel, 1998) para embriões *in vivo*.

No julgamento dos aspectos morfológicos, várias características devem ser observadas, tais como: tamanho, forma, cor, brilho, homogeneidade do citoplasma, forma e integridade da zona pelúcida, tamanho e presença de células no espaço perivitelino e presença de vesículas.

Embora a avaliação morfológica seja um parâmetro de qualidade, de fácil procedimento e baixo custo, é também muito subjetivo, não sendo um indicador confiável da capacidade do embrião de iniciar uma gestação (Pontes *et al.*, 2009; Pontes *et al.*, 2011). Para minimizar esse problema outros parâmetros do desenvolvimento embrionário podem ser associados a esse, aumentando a confiança da avaliação.

Uma característica que é rotineiramente utilizada, principalmente em estudos experimentais, é a taxa de eclosão que, em geral, deverá ocorrer no D8 de cultivo, uma vez que embriões que eclodem até esta data, são considerados de melhor qualidade dos que não eclodem (van Soom *et al.*, 1997). Além da eclosão outras avaliações morfológicas dos embriões podem ser realizadas, tais como contagem do número de células, células com atividade apoptótica, células com atividade proliferativa e cinética de desenvolvimento.

#### *Determinação do número de células*

Considerando que embriões PIV com maior número de células têm maior probabilidade de manter a gestação (van Soom *et al.*, 1997), a contagem do número total de células tem sido extensivamente utilizada como indicador da qualidade embrionária (Khurana e Niemann, 2000; Lequarre *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2005; Corrêa *et al.* 2008, Guimarães, 2013). Essa avaliação pode ser realizada utilizando corantes que tem afinidade pelo DNA, tornando visível o núcleo das células permitindo a sua contagem. Podem ser utilizados corantes como a orceína, em que a avaliação é feita em microscopia de campo claro (Pereira *et al.*, 2005; Corrêa *et al.*, 2008) ou com corante fluorescente como o Hoechst em microscopia de epifluorescência (Guimarães, 2013). Outro parâmetro que pode ser avaliado e que possui uma alta e positiva correlação com o número de células, é o diâmetro embrionário (Mori *et al.*, 2002). Sendo esta uma avaliação não invasiva, pode ser utilizado em substituição ao número de células, permitindo seleção dos melhores embriões, sem a necessidade de danificá-los ou de expo-los a UV (Makarevich *et al.*, 2005). É importante ressaltar que existe uma relação entre número de células, tamanho e estágio de desenvolvimento, portanto selecionar pelo diâmetro é válido quando embriões no mesmo estágio são comparados (Guimarães, 2013).

Além da contagem total de células, pode ser feito a contagem dos diferentes tipos celulares presentes no blastocisto. Na transição entre o estágio de mórula e blastocisto tem início a diferenciação das células embrionárias em células da massa celular interna (MCI), que darão origem ao embrião, e às células do trofoblasto, que darão origem à placenta. Portanto, a identificação do número de cada um desses tipos celulares são um indicativo ainda mais preciso da qualidade embrionária do que o número total de células. A coloração diferencial é o único método em que as células do trofoblasto e da MCI podem ser contadas de forma individual.

Essa técnica se baseia na funcionalidade e permeabilidade da membrana celular à fluorocromos como o iodeto de propídeo (IP) e aos Bis-benzimides (Hoechst H33342). Enquanto o H33342 é permeável à todas as células, o IP é incapaz de penetrar em células com membrana íntegra. Entretanto, após uma rápida exposição do embrião à um detergente, como Triton-X, ocorre uma permeabilização das células do trofoblasto, ao IP. Desta forma, as células da MCI são coradas com Hoechst, enquanto as células do trofoblastos são coradas com IP, permitindo a contagem de células individualmente de ambas as regiões do embrião (Selokar *et al.*, 2012; Van Soom *et al.*, 2001).

#### *Avaliação da atividade apoptótica e proliferativa*

Durante o desenvolvimento embrionário algumas células sofrem morte celular programada espontaneamente, o que pode estar envolvido com a eliminação de células anormais. Entretanto, durante o cultivo *in vitro* a apoptose também pode ser causada pelas condições subótimas de cultivo e, pode ser utilizada como um critério funcional da qualidade embrionária (Makarevich e Markkula, 2002). Uma das mudanças características da apoptose inclui a fragmentação do DNA (Hardy, 1997) que pode ser detectada usando o teste de TUNEL (terminaldeoxynucleotidyl transferasemediatedd-UTP nick end-labeling). Nesse as porções de DNA fragmentadas ou quebradas das células embrionárias são marcadas com d-UTP-fluorescente indicando as células em apoptose.

Recentemente, a avaliação de células apoptóticas pelo TUNEL, vem sendo associada à avaliação do potencial de desenvolvimento embrionário. Isto pode ser feito pelo uso de antígeno nuclear para a proliferação celular (PCNA), um marcador específico do ciclo celular para identificar células em divisão (Markkuda *et al.*, 2001; Kere *et al.*, 2013).

### *Cinética de desenvolvimento – Idade e estágio embrionário*

Além das características morfológicas dos embriões, outro aspecto não invasivo que pode ser considerado para aumentar a confiança na avaliação, sem causar nenhuma alteração no sistema, é a velocidade de desenvolvimento dos embriões após a inseminação *in vitro* (pi).

Tem sido identificado que embriões que clivam mais cedo têm maior possibilidade de atingir o estágio de blastocisto do que os que clivam mais tarde (Lonergan *et al.*, 1999; Lequarre *et al.*, 2003; Dode *et al.*, 2006). Uma forma de identificação dos embriões que clivam mais cedo, é identificar os embriões que apresentam 4 ou mais células no D2 de cultivo. Em recente levantamento realizado em nosso laboratório (dados não publicados), em que foram avaliados 5394 ovócitos 48 h pi, foi observado que do total de embriões com 4 ou mais células 85,5% chegaram ao estágio de blastocisto em D7. Isto mostra que a maioria dos embriões com 4 células ou mais no D2 chegaram ao estágio de blastocisto, sendo um indicativo seguro da quantidade de blastocisto que será produzida em D7. Desta forma, a seleção com base no número de blastômeros às 48 h pi, devido a sua facilidade de aplicação e objetividade, é um parâmetro que pode ser incluído na rotina da PIV.

Além do momento da primeira clivagem, o estágio de desenvolvimento em D7 de cultivo também pode ser utilizado para selecionar embriões. Estudos têm mostrado que entre os blastocistos que foram inseminados concomitantemente, aqueles que se desenvolvem mais rápido são de melhor qualidade (Saha *et al.*, 1996; George *et al.*, 2008). Além disto, aqueles blastocisto mais avançados no desenvolvimento apresentaram melhor taxa de eclosão em relação aos menos desenvolvidos após a criopreservação (Leme, 2008); Morato *et al.*, 2010). Portanto, a qualidade se refere não só à aparência morfológica e ao estágio de desenvolvimento,

mas também à idade ou velocidade em que eles atingem determinado estágio.

### *Monitoramento da cinética de desenvolvimento por time-lapse*

Embora a avaliação do número de blastômeros em D2 ou estágio de desenvolvimento embrionário no D7 de cultivo estejam relacionados a qualidade, estas avaliações só podem ser realizadas pontualmente nestes períodos. Além disto, a retirada dos embriões da estufa e sua manipulação podem causar danos ao embrião. A observação por time-lapse, entretanto, permite de forma não invasiva o monitoramento de todas as fases do desenvolvimento embrionário, sem remover os embriões da incubadora (Herrero e Meseguer, 2013). Sendo que atualmente existem diferentes equipamentos disponíveis comercialmente (Primo Vision®, EmbryoScope®, Eeva™ Test) que permitem esse tipo de avaliação.

As informações obtidas com esse monitoramento permitiram identificar aspectos específicos do desenvolvimento embrionários relacionados com a capacidade dos embriões de implantarem (Montag *et al.*, 2013). Parâmetros como o tempo de intervalo entre a primeira e segunda divisão mitótica, e o intervalo entre a segunda e a terceira divisão foram relacionados positivamente com a implantação de embriões humanos. Já a clivagem direta de 1 para 3 células, blastômeros de tamanhos diferentes no estágio de 2 células e blastômeros multinucleados no estágio de 4 células foram negativamente relacionados com implantação (Cruz *et al.*, 2012; Rubio *et al.*, 2012). Baseado nesses fatores positivos e negativos foi criado um algoritmo para uma nova seleção e classificação da qualidade embrionária (Herrero e Mesenguer, 2013).

Atualmente é a tecnologia que proporciona uma seleção objetiva mais acurada para qualidade dos embriões e está sendo extensivamente utilizada na reprodução humana. Entretanto, para animais

domésticos ainda não existe estudos para que os parâmetros relacionados com taxa de gestação possam ser estabelecidos.

#### *Avaliação do desenvolvimento embrionário pós-eclosão*

Embriões alongados de D14 de desenvolvimento representam uma ferramenta importante para avaliar vários aspectos do potencial dos embriões PIV, e pode ser um indicativo mais confiável da qualidade desses embriões. Este pressuposto está baseado em estudos, os quais reportaram que característica morfológica em embriões D14 tais como tamanho do embrião, presença e diâmetro do disco embrionário e ausência de ponto ou porções picnóticas estão associados à qualidade embrionária e à qualidade da gestação (Fisher-Brown *et al.*, 2004).

Portanto, considerando a importância de um método para avaliação de embriões PIV além da avaliação morfológica de embriões D7 e D8, o cultivo *in vitro* pós-eclosão (PHD) foi proposto como uma nova possibilidade para monitorar o desenvolvimento embrionário em uma fase tardia (Vejlsted *et al.* 2006). O sistema PHD proposto para embriões bovinos, consistia no cultivo dos embriões até D11 em meio específico e, a partir de então, os embriões eram alojados dentro de túneis preparados com gel de agarose, onde permaneciam até o D14 ou D15 (Brandão *et al.*, 2004). Embora o sistema PHD, potencialmente, permitisse uma avaliação em estágio mais tardio do desenvolvimento e, portanto mais acurada da qualidade embrionária, os resultados obtidos até o presente mostraram que o sistema é ainda ineficiente, sendo necessário aprimorá-lo para que possa ser utilizado Machado *et al.*, 2012, Machado *et al.*, 2013a; Machado *et al.*, 2013b).

Como alternativa para avaliar os embriões após a eclosão é a transferência múltipla de embriões, com posterior recuperação no D14 a D16 de desenvolvimento através de lavagem uterina (Bertolini *et al.*, 2002; Clemente *et al.*, 2011).

Quanto às características morfológicas avaliadas o tamanho dos embriões e grau de alongamento tem sido associados à qualidade dos embriões (Hue *et al.*, 2000). Além do crescimento do embrião, é importante verificar em embriões do D14, a presença, qualidade e tamanho do disco embrionário (DE), pois aqueles que apresentam DE maiores sem sinais de degeneração estão relacionado com sucesso de prenhez (Fischer-Brown *et al.*, 2004). Tanto que embriões cultivados *in vitro* até o D14 apresentaram DE drasticamente menores do que os embriões produzidos *in vitro* até D7 e, transferidos para o útero de receptoras onde permaneceram do D7 ao D14 (Machado *et al.*, 2013a; Machado *et al.*, 2013b).

#### *Testes metabólicos – metabolômica*

Várias tentativas têm sido feitas para desenvolver um biomarcador metabólico para a qualidade embrionária que indiquem o *status* fisiológico do embrião de forma não invasiva. Esses estudos objetivam avaliar se os componentes que o embrião utiliza e secreta no meio de cultivo podem ser relacionados com sua qualidade e taxa de prenhez. A maioria dos estudos avalia classes de metabólitos já conhecidos como a glicose ou focam em uma classe específica de metabólitos como amino ácidos ou ácidos graxos, usando técnicas de cromatografia para quantificar a captação e utilização desses no meio de cultivo (Singh e Sinclar, 2007; Gardner *et al.*, 2012).

O perfil metabólico de amino ácidos, o perfil da atividade glicolítica e a medida da concentração de O<sub>2</sub> por HPLC no meio de cultivo de embriões humanos tem sido indicado como método não invasivo para a seleção de embriões baseado na sua relação com embriões que resultam ou não em gestação (Houghton *et al.*, 2002; Brison *et al.*, 2004; Tejera *et al.*, 2012). Apesar, desses testes serem válidos como prognósticos, a sua aplicabilidade é muito restrita devido à complexidade do diagnóstico e a

necessidade de equipamentos altamente sofisticados.

Entretanto, os estudos hoje estão voltados para as novas técnicas de metabolômica que permitem detectar mudanças na distribuição e concentração de uma larga gama de metabólitos em vários fluidos biológicos, utilizando principalmente, tecnologias baseadas em Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massa (EM). Com essas técnicas é possível fazer uma caracterização do perfil metabólico - “profiling” que envolve a detecção e quantificação de inúmeros metabólitos sendo essa a principal abordagem que permite por exemplo, verificar mudanças na composição do meio, de acordo com a presença de embriões de melhor ou pior qualidade (Botros *et al.*, 2008). A análise metabolômica baseada na Espectroscopia de Raman e Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) já foi utilizada em meio de cultivo de embriões humanos e seus resultados foram relacionados ao estabelecimento da gestação (Seli *et al.*, 2008; Vergouw *et al.*, 2008). Outros estudos utilizando essa técnica também foram realizados com fluido folicular correlacionando os resultados com a capacidade de desenvolvimento de ovócitos humanos (Wallace *et al.*, 2012). Outras aplicações descritas utilizando Espectroscopia transformada por Fourier (FT-IR) no meio de cultivo para determinar o sexo do embrião (Muñoz *et al.*, 2014a), e do plasma para prever a prenhez de receptoras que receberam embriões de doadoras superovuladas (Muñoz *et al.*, 2014b).

#### *Padrão da expressão de genes (mRNA) relacionados à qualidade embrionária – transcriptoma*

Estudos têm mostrado que existe uma diferença entre a abundância relativa de alguns genes que são importantes para o desenvolvimento embrionário no estágio de blastocisto e, que poderiam explicar a diferença na qualidade dos embriões PIV (Rizos *et al.*, 2002; Lonergan *et al.*, 2006; Mundin *et al.*, 2009; Machado *et*

*al.*, 2013a,b). A escolha dos genes a serem avaliados nesse tipo de estudo, em geral, é baseada no transcriptoma dos embriões com alta e baixa qualidade. O Transcriptoma pode ser analisado pela técnica de microarranjo, que consiste em uma lâmina que contém milhares de genes, e o RNA/cDNA da amostra é marcado e hibridizado nessa lâmina. e, a análise computacional da fluorescência fornece informação sobre o padrão de expressão de RNA das células analisadas. A outra estratégia é o seqüenciamento (RNA seq), em que em vez de usar a hibridização na lâmina para obter informação das moléculas de RNA, se seqüencia diretamente as amostras e a seqüência dos transcritos são comparadas a um genoma de referência (Malone e Oliver, 2011).

A avaliação da qualidade do embrião pelo uso do perfil transcricional ainda está em fase de estudo. Alguns genes já foram identificados como diferencialmente expressos em embriões que resultaram em prenhez ou em nascimento (El-Halawany *et al.*, 2004) e outros por estarem envolvidos com o metabolismo da glicose e estresse (Corrêa *et al.* 2008, Machado *et al.*, 2011).. Entretanto, ainda não se tem dados suficientes do padrão de expressão de genes em blastômeros ou células embrionárias para que se possa estabelecer um sistema para selecionar um embrião com alta ou baixa qualidade.

Atualmente, a técnica mais próxima de se utilizar dados de transcriptoma para avaliar embriões é o uso das células do cumulus. É bem conhecido que as comunicações bi-direcionais entre ovócitos e as células do cumulus ocorrem durante o desenvolvimento folicular (Thomas *et al.*, 2004 ; Makabe *et al.*, 2006) e são essenciais no desenvolvimento e aquisição da competência em ovócitos mamíferos (Fair, 2003). Esse diálogo entre ovócito e células do cumulus é mediado principalmente através de junções intercelular do tipo gap (Herlands e Schultz, 1984) que permanecem funcionais até a maturação ovocitária (Atef *et al.*, 2005). Portanto, as mensagens estocadas nas células do cumulus

podem ser indicadoras do *status* do ovócito. Desta forma, o estudo da expressão de genes nessas células pode auxiliar na identificação de marcadores para a qualidade embrionária que poderiam ser utilizados, sem afetar a viabilidade do ovócito.

Vários genes marcadores para o desenvolvimento embrionário nas células do cumulus utilizando microarranjo tem sido identificados (Bettegowda *et al.*, 2008; Hamel *et al.*, 2008; Caixeta *et al.*, 2009; Assidi *et al.*, 2010; Regassa *et al.*, 2011 Cordeiro, 2011).

Apesar de vários candidatos os marcadores para embriões nas células do cumulus terem sido identificados e serem promissores, eles ainda precisam ser mais bem validados para serem utilizados em conjunto em um único procedimento para selecionar os embriões. Considerando que marcadores na CC podem ser usados para avaliar de forma não invasiva e precoce os embriões, existe uma necessidade de se continuar avançando nessa tecnologia.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A seleção de embriões com maior potencial para estabelecer uma prenhez tem sido uma busca constante dos embriologistas, pois quanto mais acurado for o método maior a chance do embrião selecionado de manter a gestação. Isso se aplica não só para a PIV, mas também a todas as demais técnicas de reprodução assistida.

Portanto, existe uma grande necessidade de se refinar ou tornar mais acurados os métodos existentes e/ou se desenvolver novos parâmetros mais robustos e de preferência não invasivos para garantir que somente os melhores embriões sejam transferidos.

A maioria dos testes apresentados é invasiva ou destroem o embrião, e se por um lado não poderão ser utilizados para a seleção embrionária, por outro são fundamentais para o

desenvolvimento de métodos para que essa seleção seja mais acurada.

Os únicos métodos apresentados que podem ser utilizados na rotina são a avaliação morfológica associada a outros parâmetros como tamanho, estágio, aparência do botão embrionário, momento da clivagem e velocidade de desenvolvimento. O outro, também se refere à morfologia e cinética, mas com uma avaliação mais objetiva através do time-lapse, que apesar de estar sendo rotineiramente utilizado em clínicas de reprodução humano, ainda não tem os parâmetros estabelecidos para os embriões de animais domésticos.

Outra técnica promissora é baseada na grande quantidade de informações geradas pelos estudos de transcriptoma quanto ao padrão normal e alterado de genes comprovadamente envolvidos na qualidade do embrião. Com esses padrões de expressão pode-se criar um padrão transcricional que seja específico para embriões com potencial ou não de gerar um prenhez. Entretanto, a maior expectativa está no estabelecimento de padrões metabólicos no meio de cultivo, que possam identificar embriões saudáveis e prever a taxa de gestação. Essa abordagem tem a grande vantagem de ser não invasiva, e por isso tem grande potencial para se tornar método para avaliar a qualidade de embriões PIV.

É importante salientar também, que por melhor que seja o método de seleção esse é apenas um fator responsável pelo estabelecimento da prenhez, não se pode esquecer que o útero, ou o ambiente uterino é tão importante quanto à qualidade do embrião para o estabelecimento e manutenção da gestação.

## REFERÊNCIAS

- Assidi M, Montag M, Van der Ven K, Sirard MA. Biomarkers of human oocyte developmental competence expressed in cumulus cells before ICSI: a preliminary study. *J Assist Reprod Genet*, 2010; 28:173-188.
- Atef A, François P, Christian V, Marc-André S. The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev*, 2005; 71:358-367.
- Bertolini M, Beam SW, Shim H, Bertolini LR, Moyer AL, Famula TR, Anderson GB. Growth, development, and gene expression by in vivo- and in vitro-produced day 7 and 16 bovine embryos. *Mol Reprod Dev*, 2002; 63:318-328.
- Bettegowda A, Patel OV, Lee KB, Park KE, Salem M, Yao J, Ireland JJ, Smith GW. Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications. *Biol Reprod*, 2008; 79:301-309.
- Botros L, Sakkas D, Seli E. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol Hum Reprod*, 2008; 14:679-690.
- Brandão DO, Hyttel P, Lovendahl P, Rumpf R, Stringfellow D, Callesen H. Post hatching development: a novel system for extended in vitro culture of bovine embryos. *Biol Reprod*, 2004; 71:2048-2055.
- Brison DR, Houghton FD, Falconer D, Roberts SA, Hawkhead J, Humpherson PG, Lieberman BA, Leese HJ. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod*, 2004; 19: 2319-2324.
- Caixeta ES, Ripamonte P, Franco MM, Junior JB, Dode MA. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reprod Fertil Dev*, 2009; 21:655-664.
- Clemente M, Lopez-Vidriero I, O'Gaora P, Mehta JP, Forde N, Gutierrez-Adan A, Lonergan P, Rizos D. Transcriptome changes at the initiation of elongation in the bovine conceptus. *Biol Reprod*, 2011; 85:285-295.
- Corcoran D, Fair T, Park S, Rizos D, Patel OV, Smith GW, Coussens PM, Ireland JJ, Boland MP, Evans AC, Lonergan P. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryo. *Reproduction*, 2006; 131:651-660.
- Cordeiro DM. Identificação de marcadores moleculares para a competência ovocitária em células do cumulus bovinas. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011; 136 p. Tese de Doutorado.
- Corrêa GA, Rumpf R, Mundim TC, Franco MM, Dode MA. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Anim Reprod Sci*, 2007; 104:132-142.
- Cruz M, Garrido N, Herrero J, Pérez-Cano I, Muñoz M, Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online*, 2012; 25:371-81
- Dode MA, Dufort I, Massicotte L, Sirard MA. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. *Mol Reprod Dev*, 2012; 73:288-297.
- El-Halawany N, Ponsuksili S, Wimmers K, Gilles M, Tesfaye D, Schellander K. Quantitative expression analysis of blastocyst-derived gene transcripts in preimplantation developmental stages of in vitro-produced bovine embryos using real-time polymerase chain reaction technology. *Reprod Fertil Dev*, 2004; 16:753-762.
- Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci*, 1998; 78:203-216.



- Fischer-brown AE, Lindsey BR, Ireland FA, Northey DL, Monson RL, Clark SG, Wheeler MB, Kesler DJ, Lane SJ, Weigel KA, Rutledge JJ. Embryonic disc development and subsequent viability of cattle embryos following culture in two media under two oxygen concentrations. *Reprod Fert Dev*, 2004; 16:787-793.
- Gardner DK, Phil D, Wale PL. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertil Steril*, 2013; 99:1062-1070.
- George F, Daniaux C, Genicot G, Verhaeghe B, Lambert P, Donnay I. Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: embryo development and quality before and after transient transfer. *Theriogenology*, 2008; 69:612-23.
- Guimarães ALS. Avaliação de diferentes sistemas de maturação para aumentar a competência de ovócitos bovinos. Brasília: Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, 2013; 84p. Dissertação de Mestrado.
- Hamel M, Dufort I, Robert C, Gravel C, Leveille MC, Leader A, Sirard MA. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Hum Reprod*, 2008; 23:1118-1127.
- Hardy K. Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol Hum Reprod*, 1997; 3:919-925.
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE & Trimmer SA. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 1995; 43:141-152.
- Herlands RL, Schultz RM. Regulation of mouse oocyte growth: probable nutritional role for intercellular communication between follicle cells and oocytes in oocyte growth. *J Exp Zool*, 1989; 229:317-325.
- Herrero J, Meseguer M. Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: the era of morphokinetics. *Fertil Steril*, 2013; 99:1030-1034.
- Houghton FD<sup>1</sup>, Hawkhead JA, Humpherson PG, Hogg JE, Balen AH, Rutherford AJ, Leese HJ. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod*, 2002; 17:999-1005.
- Kere M, Siriboon C, Lo NW, Nguyen NT, Ju JC. Ascorbic acid improves the developmental competence of porcine oocytes after parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transplantation. *J Reprod Dev*, 2013; 59:78-84.
- Khurana NK, Niemann H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, 2000; 54:741-756.
- Lequarre AS, Marchandise J, Moreau B, Massip A, Donnay I. Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for in vitro produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. *Biol Reprod*. 2006; 69:1707-1713.
- Lequarre AS, Marchandise J, Moreau B, Massip A, Donnay I. Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for in vitro produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. *Biol Reprod*, 2003; 69: 1707-1713.
- Leme LO. Efeito da fonte protéica durante o cultivo na qualidade e quantidade de embriões bovinos produzidos in vitro. p82. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Universidade de Brasília, Brasília. 2008.
- Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans AC. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, 2006; 65:137-152.
- Lonergan P, Khatir H, Piumi F, Rieger D, Humblot P, Boland MP. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J Reprod Fertil*, 1999; 117:159-167.

- Machado GM, Caixeta ES, Lucci CM, Rumpf R, Franco MM, Dode MA. Post-hatching development of bovine embryos in vitro: the effects of tunnel preparation and gender. *Zygote*, 2011; 20:123-134.
- Machado GM, Ferreira AR, Guardieiro MM, Bastos MR, Carvalho JO, Lucci CM, Diesel TO, Sartori R, Rumpf R, Franco MM, Dode MA. Morphology, sex ratio and gene expression of day 14 in vivo and in vitro bovine embryos. *Reprod Fertil Dev*, 2013a; 25:600-608.
- Machado GM, Ferreira AR, Pivato I, Fidelis A, Spricigo JF, Paulini F, Lucci CM, Franco MM, Dode MA. Post-hatching development of in vitro bovine embryos from day 7 to 14 in vivo versus in vitro. *Mol Reprod Dev*, 2013b. 80:936-947.
- Makabe S, Naguro T, Stallone T. Oocyte-follicle cell interactions during ovarian follicle development, as seen by high resolution scanning and transmission electron microscopy in humans. *Microsc Res Tech*, 2006. 69:436-449.
- Malone JH, Oliver B. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biol*, 2011. 9:34.
- Mano Y, Kotani T, Shibata K, Matsumura H, Tsuda H, Sumigama S, Yamamoto E, Iwase A, Senga T, Kikkawa F. 2011. The loss of endoglin promotes the invasion of extravillous trophoblasts. *Endocrinology*, 2011; 152:4386-4394.
- Markkula M, Rätty M, Jauhiainen L, Paranko J, Raula J, Makarevich A. Ratio of proliferating cell nuclear antigen-positive nuclei total cell number is higher in day 7 than in day 8 vitrified in vitro produced bovine embryos. *Biol Reprod*, 2001, 65:52-59.
- Montag M, Toth B, Strowitzki T. 2013. New approaches to embryo selection. *Reprod Biomed Online*, 27:539-46.
- Mori M, Otoi T, Suzuki T. 2002. Correlation between the cell number and diameter in bovine embryos produced in vitro. *Reprod Domest Anim*, 37:181-184.
- Mundim TC, Ramos AF, Sartori R, Dode MA, Melo EO, Gomes LF, Rumpf R, Franco MM. 2009. Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced in vitro, by natural ovulation, or hormonal superstimulation. *Genet Mol Res*, 24:1398-13407.
- Muñoz M, Uyar A, Correia E, Ponsart C, Guyader-Joly C, Martínez-Bello D, Marquant-Le Guienne B, Fernandez-Gonzalez A, Díez C, Caamaño JN, Triga B, Humblot P, Carrocera S, Martin D, Seli E, Gomez E. 2014a. Non-invasive assessment of embryonic sex in cattle by metabolic fingerprinting of in vitro culture medium. *Metabolomics*, epub 2014
- Muñoz M, Uyar A, Correia E, Ponsart C, Guyader-Joly C, Martínez-Bello D, Marquant-Le Guienne B, *et al.*, 2014a. Metabolomic prediction of pregnancy viability in superovulated cattle embryos and recipients with fourier transform infrared spectroscopy. *Biomed Res Int*, epub 2014.
- Pereira DC, Dode MA, Rumpf R. 2005. Evaluation of different culture systems on the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, 63:1131-1141.
- Pontes JH, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JG, Uvo S, Barreiros TR, Oliveira JA, Hsler JF, Seneda MM. 2009. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, 71:690-797.
- Pontes JH, Melo Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KC, Seneda MM. 2011. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle donors. *Theriogenology*, 75:1640-1646.
- Regassa A, Rings F, Hoelker M, Cinar U, Tholen E, Looft C, Schellander K, Tesfaye D. 2011. Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte

- and its companion cumulus cells. *BMC Genomics*, 24:12-:57.
- Rizos D, Lonergan P, Boland MP, Arroyo-García R, Pintado B, de la Fuente J, Gutiérrez-Adán A. 2002. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol Reprod*, 66:589-595.
  - Rubio I, Kuhlmann R, Agerholm I, Kirk J, Herrero J, Escribá MJ, Bellver J, Meseguer M. 2012. Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertil Steril*, 98:1458-1463.
  - Saha S, Rajamahendran R, Boediono A, Sumantri C, Suzuki T. 1996. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture *in vitro* following vitrification and one-step rehydration. *Theriogenology*, 46:331-343.
  - Seli E, Botros L, Sakkas D, Burns DH. 2008. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing *in vitro* fertilization. *Fertil Steril*, 90:2183-2189.
  - Selokar NL, Saini M, Muzaffer M, Krishnakanth G, Saha AP, Chauhan MS, Manik R, Palta P, Madan P, Singla SK. 2012. Roscovitine treatment improves synchronization of donor cell cycle in G0/G1 stage and *in vitro* development of handmade cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Cell Reprogram*, 14:146-154.
  - Singh R, Sinclair KD. 2007. Metabolomics: approaches to assessing oocyte and embryo quality. *Theriogenology*, 68:56-62.
  - Sringfellow DA, Seidel S. 1998. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 3 ed. Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 1998. 180p.
  - Tejera A, Herrero J, Vilorio T, Romero JL, Gamiz P, Meseguer M. 2012. Time-dependent O<sub>2</sub> consumption patterns determined optimal time ranges for selecting viable human embryos. *Fertil Steril*, 98:849-857.
  - Thomas RE, Armstrong DT, Gilchrist RB. 2004. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during *in vitro* maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. *Biol Reprod*, 70:548-556.
  - Trigo B, Gómez E, Caamaño JN, Muñoz M, Moreno J, Carrocera S, Martín D, Diez C. 2012. *In vitro* and *in vivo* quality of bovine embryos *in vitro* produced with sex-sorted sperm. *Theriogenology*, 78:1465-1475.
  - Van Soom A, Vanroose G, de Kruif A. 2001. Blastocyst evaluation by means of differential staining: a practical approach. *Reprod Domest Anim*, 36:29-35.
  - Van Soom A, Ysebaert MT, de Kruif A. 1997. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in *in vitro*-produced bovine embryos. *Mol Reprod Dev*, 47:47-56.
  - Vejlsted M, Du Y, Vajta G, Maddox-Hyttel P. 2006. Post-hatching development of the porcine and bovine embryo--defining criteria for expected development *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*, 65:153-165.
  - Vergouw CG, Botros LL, Roos P, Lens JW, Schats R, Hompes PG, Burns DH, Lambalk CB. 2008. Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. *Hum Repro*, 23:1499-1504.
  - Wallace M, Cottell E, Gibney MJ, McAuliffe FM, Wingfield M, Brennan L. 2012. An investigation into the relationship between the metabolic profile of follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome. *Fertil Steril*, 97:1078-1084.