



## **Biotechnologias da reprodução animal: de Aristóteles à edição gênica**

*Biotechnologies of animal reproduction: from Aristotle to gene editing*

**José Luiz Rodrigues<sup>‡</sup>, Marcelo Bertolini**

Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução, Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

### **Resumo**

Atualmente, com a rapidez e a facilidade da difusão da informação, os jovens acadêmicos têm percepção de que o conhecimento é um produto pronto, onde as características podem ser manipuladas e empregadas como um objeto oriundo de uma fábrica. A compreensão da realidade que nos cerca é um desejo desde os primórdios da presença do homem sobre a terra e os conceitos se modificam na medida em que o conhecimento avança. As tecnologias reprodutivas surgiram e evoluíram ao longo dos tempos, levando a aplicações com diferentes impactos na produção e seleção animal, com repercussões na saúde animal, na saúde humana, na preservação de espécies em extinção e em diferentes cenários da atividade humana. Este texto traça uma linha de tempo das ações em reprodução animal, sob a ótica dos autores, dando ênfase ao gradual desenvolvimento das biotécnicas como ferramenta auxiliar na rotina experimental e nos diversos sistemas de produção animal.

**Palavra-chaves:** animal, reprodução, biotécnicas, história, gametas, embrião e germoplasma.

### **Abstract**

*Today the rapid and ease information diffusion makes young academics have a perception that knowledge is a ready product, where characteristics could be manipulated and used as an object from a factory. The understanding of the reality that surrounds us is a desire from the earliest days of man's presence on earth and the concepts change as knowledge advances. Reproductive technologies have emerged and evolved over time, leading to applications with different impacts on animal production and selection, with repercussions on animal and human health, on the preservation of endangered species and on different scenarios of human activity. This text summarizes the evolution of thought, knowledge and actions in animal reproduction from the perspective of the authors, emphasizing the gradual development of biotechnology as an auxiliary tool in the experimental routine and in the various systems of animal production.*

**Keywords:** reproduction, biotechniques, history, gametes, embryo and germplasm

### **Introdução**

Na Grécia antiga, berço da filosofia, foi onde surgiram termos atualmente utilizados como sinônimos de lugares que abrigam os sábios e guardam o conhecimento, como por exemplo *liceu*, que denominava a escola de filosofia de Aristóteles, e *academia*, assim chamada a escola filosófica de Platão.

O que é vida? Como o indivíduo é gerado? Quais os tipos de reprodução? Estas e outras questões estão presentes desde a antiguidade. O primeiro homem a tentar organizar o conhecimento nesta área foi Aristóteles de Estagira (384-322 AC). Exponente da intelectualidade da antiguidade, preceptor de Alexandre o Grande, foi o responsável pela criação da famosa biblioteca de Alexandria. Aristóteles sistematizou a vida em dois grandes reinos: vegetal e animal. Pioneiro na biologia esclareceu conceitos a respeito da origem da vida aos seus contemporâneos. Durante a sua profícua existência procurou identificar, hierarquizar e caracterizar a vida animal e vegetal, tentando iluminar de que forma acontecia a reprodução dos seres vivos. Aristóteles observou que as jovens, à sua época, casavam após a menarca e logo engravidavam deixando de menstruar. Ele se perguntou: o que gera o feto? A resposta genial foi: o feto tem origem no sangue menstrual. Dele são os conceitos da origem da vida a partir de um genitor, de dois genitores e espontânea. O conceito de geração espontânea, a vida gerada a partir da não vida, foi considerado verdade científica durante vinte e um séculos, até meados do século XIX, momento em que foi refutado definitivamente pelos elegantes experimentos de Louis Pasteur (1822-1895).

A doutrina aristotélica foi incorporada a Bíblia e, segundo diferentes opiniões, foi o que travou o desenvolvimento científico durante a idade média até o renascimento das artes e das ciências a partir do século XV. Levando este fato em consideração, uma definição de verdade científica que se pode empregar para estimular a discussão acadêmica é a seguinte: “*é a mentira que em um determinado momento a maioria aceita como verdade*”. Neste período da história qualquer afirmação que contrariasse as sagradas escrituras era objeto de um processo inquisitório e usualmente o autor da blasfêmia terminava condenado à morte na fogueira.

Na lógica da época, também se pensava que os testículos serviam de contrapeso para a função erétil. Em 1651, o médico e cientista inglês William Harvey (1578-1657), conhecido por ter descrito a circulação sanguínea corpórea, publicou o livro “*Exercitationes de generatione animalium*”, onde pela primeira vez se afirmou que a vida

<sup>‡</sup>Correspondência: joseluiz.rodrigues@ufrgs.br

Recebido: 15 de fevereiro de 2019

Aceito: 19 de março de 2019



tem origem no ovo. Neste período, Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) relatou o emprego do microscópio, que foi posteriormente aprimorado, permitindo a observação e a descrição dos espermatozoides, à época denominados de animalculos (animais muito pequenos, visíveis somente ao microscópio). A observação de seres microscópicos e das metamorfoses pelas quais algumas formas de vida passam, propiciou o surgimento da teoria da pré-formação (animalculistas), onde se acreditava que o futuro indivíduo já estaria pré-formado em um dos gametas (homúnculo), no óvulo ou no espermatozoide. A partir deste momento se iniciou uma polêmica que durou mais de 200 anos: a vida teria origem no óvulo ou no espermatozoide? Até o final do século XVIII e início do XIX já haviam sido descritas três diferentes descobertas em fisiologia reprodutiva: Lazzaro Spallanzani (1729-1799) relatou o sucesso na fecundação *in vitro* em rãs; Karl Ernst von Baer (1792-1876) em sua obra “*De Ovi Mammalium et Hominis Genesi*” descreveu a primeira visualização do oócito de mamíferos no ovário de um canídeo e relatou que os mamíferos se desenvolvem a partir do óvulo. Até então, os cientistas que defendiam como fonte da vida o óvulo eram denominados “ovistas” e os que defendiam o espermatozoide, eram chamados de “espermistas”. Neste meio tempo, Spallanzani descobriu e descreveu diferentes processos fisiológicos na reprodução animal, mostrando que ambos o sêmen e o óvulo eram necessários para o estabelecimento da prenhez. Não obstante, somente ao final do século dezanove, passados mais de 200 anos, com os esclarecimentos da divisão celular meiótica e da fecundação, é que esta querela animalculista entre os cientistas foi resolvida.

Karl Ernst von Baer fundou a embriologia comparativa, descrevendo o desenvolvimento dos folhetos embrionários, e descrevendo em seu livro “*Über Entwicklungsgeschichte der Thiere*” a evolução dos estágios de desenvolvimento de vertebrados. Apesar de ser um dos árdios críticos da teoria evolutiva de Charles R. Darwin (1809-1882), ironicamente nas chamadas *Leis de von Baer* para a embriologia, onde há uma descrição do desenvolvimento desde atributos gerais dos vertebrados até características específicas da própria espécie, von Baer forneceu bases para Darwin fundamentar sua obra “*A Origem das Espécies*”.

### Desenvolvimento das Biotécnicas de Reprodução

No contexto histórico a moderna reprodução animal nasceu na Escola de Agricultura de Cambridge, na Inglaterra, em meados do século 19, onde novas ideias como, por exemplo, a multiplicação do potencial reprodutivo dos animais através da inseminação artificial (IA) e da transferência de embriões (TE) foi discutida de maneira pragmática.

Desde o final do século 19, o impulso para o controle de processos reprodutivos em animais promoveu um avanço significativo do conhecimento, proporcionando o desenvolvimento gradual de quatro gerações de biotecnologias da reprodução, as quais têm sido de importância em diferentes espécies mamíferas. Em termos gerais, as três primeiras gerações incluem (1) a inseminação artificial (IA), a congelamento de gametas e embriões, (2) a múltipla ovulação e a transferência de embriões (MOET) (produção *in vivo* de embriões); e (3) a produção *in vitro* (PIV) de embriões. Estas biotécnicas evoluíram para aplicações comerciais bem-sucedidas, associadas ao desenvolvimento e domínio de outras biotécnicas de suporte que cresceram paralelamente, como a ultrassonografia e sexagem de espermatozoides e embriões, facilitando o aumento da produção e produtividade pecuária no mundo pela seleção genética, redução do intervalo entre gerações, controle de doenças e a redução nos custos de produção. A quarta geração abrange processos menos eficientes e ainda, pode-se considerar, experimentais, que compreendem a clonagem por transferência nuclear (TN), a engenharia genética, incluindo a transgenia, a edição genômica e a biologia das células-tronco. Tais tecnologias estão interligadas entre si e com as *ômicas*, sendo de uma forma ou de outra, dependentes das demais biotécnicas.

Interessante é que podemos considerar a transferência de embriões e não a IA como a biotécnica marco da reprodução animal moderna, seguida da clonagem animal, todos sendo eventos em desenvolvimento já na virada do século 19. Naquela época, Walter Heape, considerado por muitos como o pai da moderna embriologia, relatou o sucesso da TE em coelhos. Heape (1891) transferiu dois embriões coletados de uma fêmea Angora para a tuba uterina de uma receptora da raça Hare Belgian. No parto foram observados dois Angora e quatro Hare Belgian. Os seus experimentos demonstraram pela primeira vez que embriões podem se desenvolver no útero de uma fêmea receptora. Atualmente, a produção *in vivo* de embriões bovinos, iniciada nos anos 1970 e comercialmente bem estabelecida a partir dos anos 1980, é uma biotécnica reprodutiva que aumenta o potencial reprodutivo da fêmea.

Já a IA, demonstrada como efetiva por Spallanzani há mais de 200 anos, tem sido a biotecnologia de reprodução mais eficiente e bem-sucedida na produção animal desde o início do século XX. O biólogo russo Ilya Ivanovich Ivanov (1870-1932) aperfeiçoou a IA e seu uso prático, visando o aumento da eficiência reprodutiva do rebanho equino do Czar russo Nicolau II, da Dinastia Romanov. Ivanov expandiu a tecnologia do sêmen e o emprego da IA treinando técnicos russos e estrangeiros, que por sua vez disseminaram seu uso em diferentes regiões do mundo.

A denominação *clonagem animal* é reconhecida quando realizada pelos procedimentos da transferência nuclear (TN), um processo idealizado na primeira metade do século 20 pelo cientista alemão Hans Spemann, apesar de três procedimentos experimentais gerarem gêmeos idênticos ou clones: desagregação de blastômeros em estádios precoces do desenvolvimento embrionário, bipartição de embriões após as fases de compactação ou de cavitação, e TN utilizando blastômeros ou células somáticas. Spemann, considerado por muitos como o pai da clonagem animal, líder da “*Escola de Embriologia de Freiburg*” foi um expoente da embriologia experimental, contribuindo com seus



estudos para a compreensão de eventos sobre a diferenciação celular e totipotencialidade. Em 1902 empregou anfíbios (salamandras e anuros) como modelos de elegantes e engenhosos experimentos pioneiros sobre bipartição embrionária e sobre TN em 1924. Spemann teve seu trabalho reconhecido por elaborar a conhecida *Teoria da indução* através da outorga do Prêmio Nobel de Fisiologia/Medicina de 1935. Os avanços em seus estudos, que envolveram instrumentação simples e procedimentos elaborados, levaram-no a propor, em 1938, o que ele chamaria de Experimento Fantástico. No ensaio *Embryonic Development and Induction* (The American Journal of the Medical Sciences. 196(5):738, nov 1938) lança as bases da moderna clonagem animal por TN, conceitos que descrevem ideias que, sob o olhar técnico e teórico, forneceram o alicerce para o sucesso posterior neste campo, ainda largamente utilizado nos dias atuais. Então, antes mesmo de que se dominassem procedimentos de PIV de embriões pela fecundação *in vitro* (FIV), ou mesmo de superovulação e TE em espécies mamíferas de interesse econômico, os conceitos teóricos e descrições técnicas dos procedimentos da clonagem já eram de domínio público.

Lazzaro Spallanzani foi o primeiro a realizar a FIV em anfíbios, um processo que resultou em contínuos fracassos por quase dois séculos em mamíferos de fecundação interna. Neste período, o austríaco Leopold Schenk, um dos pioneiros neste campo, relatou em 1878 tentativas de realizar a fecundação extracorpórea e, embora seus métodos fossem extremamente avançados para época, não alcançou sucesso. Somente em 1959 Min Chueh Chang relatou o nascimento de coelhos após a transferência de zigotos obtidos a partir de ovócitos maturados *in vivo* e fecundados *in vitro* com sêmen recuperado dos cornos uterinos de coelhas 12 h após o acasalamento. Na sua experiência, os ovócitos foram mantidos com a suspensão de espermatozoides em uma incubadora com agitação a 38°C durante 3 a 4 h. Os zigotos foram então cultivados durante mais 18 h. Um total de 55 de 266 estruturas (21%) atingiu o estágio de quatro células antes da transferência. De trinta e seis embriões transferidos para seis receptoras, quinze produtos nasceram de quatro receptoras. Este foi o primeiro estudo que descreve uma técnica de FIV repetível em mamíferos e é, atualmente, aceita como a primeira FIV realizada inequivocamente com sucesso em mamíferos.

Não obstante, dos insucessos de Schenk a partir de 1878 ao sucesso de Chang em 1959, inúmeras tentativas para fecundar *in vitro* ovócitos de mamíferos foram realizadas, sendo a maioria infrutífera, com os estudos não conseguindo demonstrar inequivocamente que a clivagem embrionária era de fato devido à penetração do espermatozoide e não a outras causas de ativação. Além disso, o fenômeno da capacitação espermática ainda era desconhecido, impedindo avanços no campo por mais de meio século. O passo crítico para o sucesso da FIV foi a descoberta do fenômeno da capacitação espermática 1951, descrito de forma independente por Colin R. Austin na Austrália e por Min C. Chang nos EUA. Usando coelhos e ratos ou apenas coelhos, Austin e Chang postularam que os espermatozoides devem ficar por um período no aparelho reprodutor feminino, mais especificamente na tuba uterina, para adquirir a capacidade fecundante, o que permitiria a sua penetração em ovócitos maduros. A palavra "capacitação" foi cunhada por Austin em 1952 para designar o fenômeno da maturação dos espermatozoides no trato genital feminino.

Na sequência de descobertas da década de 1950 que culminaram com o sucesso de Chang em coelhos em 1959, os anos 1960 e os anos 1970 compreenderam um período de intensa atividade científica na área da FIV, que produziu avanços na compreensão da fisiologia da fecundação e pré-implantação embrionária. No trabalho inicial na FIV eram empregados fluidos biológicos de composição desconhecida como meio de cultivo. Whitten (1956) substituiu a albumina do ovo de galinha, comumente usada, por albumina de soro bovino para produzir o primeiro meio quimicamente semi-definido, que permitia o desenvolvimento de embriões murinos do estágio de 8-células ao estágio de blastocisto. Whitten (1957) relatou que embriões murinos de 2-células se desenvolviam até blastocistos se lactato fosse adicionado ao meio. Mais tarde, Biggers et al. (1967) demonstraram que para ocorrer a primeira clivagem era necessária a presença de piruvato no meio de cultivo. Estas observações estabeleceram as bases para a elaboração de diferentes meios de cultivo embrionário, muitos em uso até hoje nas espécies mamíferas, como a murina, humana, bovina, ovina e equina. Durante este período, a capacitação espermática *in vitro* foi relatada em hamster por Yanagamachi e Chang (1963) usando uma solução salina simples modificada de Tyrode. Além do sucesso descrito por Chang (1959) em coelhos, diferentes experimentos relataram o nascimento de descendência derivada de FIV em outras espécies, como por exemplo, no camundongo por Whittingham (1968), no rato por Toyoda e Chang (1974), e nos humanos por Steptoe e Edwards (1978).

A década de 1980 foi um período de grandes realizações no âmbito da FIV em animais de fazenda. O primeiro bezerro derivado desta biotecnologia, Virgil, nasceu em 09 de junho de 1981 e foi descrito como normal por Brackett et al. (1982). Virgil foi o resultado dos esforços de Brackett e seus colegas para desenvolver procedimentos práticos de reprodução bovina e, ao mesmo tempo, criar um modelo útil para acelerar a compreensão sobre a fecundação e o desenvolvimento embrionário em mamíferos. Os procedimentos descreveram a utilização de espermatozoides capacitados *in vitro* para a inseminação dos ovócitos maturados *in vivo*, recuperados por cirurgia do salpíngex ou de folículos ovarianos pré-ovulatórios de fêmeas bovinas. Após a FIV e um breve período de cultivo *in vitro*, os embriões no estágio de 8-células foram transferidos para o salpíngex de receptoras com ciclo estral sincronizado, resultando no nascimento de Virgil. As perspectivas para o emprego da FIV após o nascimento deste animal foram de grande otimismo, criando um novo cenário em adição à IA na reprodução animal. No entanto, devido ao complexo procedimento empregado neste experimento, com a necessidade de ovócitos serem maturados *in vivo*, os quais após a FIV deveriam ser transferidos cirurgicamente para o salpíngex, a técnica de FIV como tal não estava pronta para ser utilizada da forma sugerida pelos autores.



Após o nascimento de Virgil experimentos realizados contribuíram para o progresso da PIV de embriões bovinos. Diferentes sistemas foram desenvolvidos que compreendem três etapas básicas: (a) a maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos a partir do estágio de vesícula germinativa, coletados *in vivo* ou *post-mortem* de ovários de fêmeas doadoras; (b) a fecundação *in vitro* (FIV), pela co-incubação de ovócitos maturados e espermatozoides capacitados *in vitro*; e (c) o cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos por um período de 6 a 10 dias, até os embriões atingirem estádios de desenvolvimento que lhes permitam serem transferidos para o útero de fêmeas receptoras.

O aprimoramento gradual do procedimento, como por exemplo, das condições da MIV, da FIV e da CIV, associado à obtenção de ovócitos por métodos como a punção folicular ovariana (OPU) e mais recentemente pela utilização de sêmen sexado, aplicações das ômicas, viabilizaram o emprego comercial da PIV de embriões bovinos, em uma explosão de sua aplicação, na qual o Brasil passou a ser o principal protagonista no cenário mundial neste início de século 21.

Vale ressaltar os trabalhos brasileiros pioneiros do Prof. Enoch Borges de Oliveira Filho (UNESP/Jaboticabal) e do Dr. Assis Roberto de Bem (EMBRAPA/Cenargen) no início dos anos 1990. Tais esforços forneceram as bases para o nascimento dos primeiros bovinos de FIV no Brasil em 1993, fruto do trabalho de mestrado da colega Yeda Watanabe em Jaboticabal, o que desencadeou posteriormente o estabelecimento comercial da biotécnica pelo uso da OPU-PIV. Após, neste cenário promissor no país, destacam-se as iniciativas comerciais e a interface entre a universidade e o setor privado que conduziram ao final dos anos 1990 os colegas empreendedores André Dayan, e Yeda e Michele Watanabe no estabelecimento da empresa Vitrogen Ltda.

Atualmente o mundo científico vivencia o rápido desenvolvimento da quarta geração das biotécnicas de reprodução envolvendo o emprego das denominadas tesouras moleculares, que facilitaram a edição gênica, a transgênia e as tecnologias das células troncos. Nucleases de DNA, incluindo zinc-fingers nucleases (ZFNs), ativador de transcrição endonucleases (TALENs - transcription activator-like effector nucleases), e meganucleases, possuem longos sítios de reconhecimento e domínios de corte e são, portanto, capazes de cortar o DNA de uma maneira específica. Essas tesouras moleculares medeiam alterações genéticas direcionadas, aumentando a eficiência das taxas de mutação do DNA através da indução de quebras de fita dupla em um predeterminado local do gene. Em comparação com as técnicas de recombinação homóloga convencional, as nucleases de DNA podem aumentar a taxa de sucesso em até 10.000 vezes e a via de reparo do DNA mutagênico é estimulada em uma frequência similar. A aplicação bem-sucedida de diferentes nucleases de DNA foi demonstrada em uma infinidade de organismos, incluindo insetos, anfíbios, plantas, nematóides e mamíferos, incluindo as espécies domésticas de interesse econômico. Recentemente, outra tesoura molecular foi descrita, que emprega seqüências curtas de RNA para direcionar a um local específico do gene. As CRISPR (do inglês clustered regularly interspaced short palindromic repeats) / CAS (crispr associate protein) se originam de um mecanismo de defesa bacteriana e podem ser programadas para segmentar praticamente qualquer local do genoma. Os resultados revelam que as nucleases de DNA podem ser empregadas com sucesso em diferentes cenários da pesquisa acadêmica, que as tornam úteis para melhorar a compreensão de sistemas fisiológicos, produzindo animais geneticamente modificados, incluindo novos modelos animais para doenças humanas e criando linhas celulares específicas. As modificações genéticas também poderão ser utilizadas com objetivos na área do bem-estar animal, como por exemplo, criando linhagens de bovinos mochos, com o sexo definido, bem como resistentes a determinados patógenos.

### Considerações finais

Historicamente, além da mera curiosidade científica, o surgimento e desenvolvimento de tecnologias reprodutivas foram estimulados pelo ganho econômico oferecido pelo potencial aumento no número de descendentes de animais geneticamente superiores ou simplesmente para proteger o *pool* genético de animais de exceção. Em outras palavras, as tecnologias reprodutivas foram desenvolvidas para oferecer alternativas de uma maior difusão de germoplasmas considerados superiores. O controle dos processos reprodutivos oferece inúmeras vantagens, servindo como um instrumento essencial para a aplicação da biotecnologia na produção animal.

Dois aspectos da embriologia experimental são intemporais e acompanham de forma permanente o desenvolvimento da ciência: o primeiro é a atividade do embrião no reconhecimento e na manutenção da prenhez. O segundo é a sua vulnerabilidade frente ao ambiente em que ocorre seu desenvolvimento. Hoje com o avanço do conhecimento na biologia molecular, no cenário das ômicas, e na área da epigenética, podemos antever um cenário multifacetário no emprego das biotécnicas de reprodução, como por exemplo, a clonagem e a transgenia. Também não devemos esquecer que a maior responsabilidade dos cientistas não é somente conduzir experimentos, mas esclarecer a sociedade acerca do que se realiza nos laboratórios, procurando revelar de forma clara os objetivos, ressaltando as vantagens e as desvantagens dos resultados. Uma sociedade esclarecida, com acesso à educação de qualidade e com elevados padrões de ética e moral, constituem-se na melhor matéria prima para um mundo mais justo e igualitário no acesso ao que denominamos vida moderna.



## Referências

- Bertolini M, Bertolini LR, Gerger RPC, Batchelder CA, Anderson GB.** Developmental problems during pregnancy after *in vitro* embryo manipulations. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.391-405, 2007.
- Bertolini M, Bertolini LR.** Advances in reproductive technologies in cattle: from artificial insemination to cloning. *Rev Med Vet Zoot*, v.56, p.184-194, 2009.
- Betteridge KJ.** A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Anim Reprod Sci*, v.79, p.203-244, 2003.
- Betteridge KJ.** Farm animal embryo technologies: Achievements and perspectives. *Theriogenology*, v.65, p.905-913, 2006.
- Biggers JD.** IVF and embryo transfer: historical origin and development. *Reprod BioMed Online*, v.25, p.118-127, 2012.
- Foote RH.** Development of reproductive biotechnologies in domestic animals from artificial insemination to cloning: a perspective. *Cloning*, v.1, p.133-142, 1999.
- Foote RH.** The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J Anim Sci*, v.80, p.1-10, 2002.
- Gardner DK, Lane M, Watson AJ.** A Laboratory Guide to the Mammalian Embryo, 2004.
- Gordon I.** Laboratory production of cattle embryos. 2nd ed. Wallingford, UK: CABI Publishing. 548pp, 2003. (Biotechnology in Agriculture Series, n. 27).
- Hartman C.G.** Physiological mechanisms concerned with conception – an inventory of unanswered questions. *J Reprod Fertil*, v.1, p.283-293, 1960.
- Hasler JF.** The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim Reprod Sci*, v.79, p.245-264, 2003.
- Heape, W.** Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. *Proc R Soc*, v.48, p.457-458, 1891.
- Houdebine LM.** Animal Transgenesis and Cloning. West Sussex: Wiley, p.250, 2003.
- Hyttel P, Sinowatz F, Vejlsted M, Betteridge K.** Essentials of Domestic Animal Embryology, Saunders Elsevier, Edinburgh, UK 2009.
- Johnson MH, Edwards, R.** The path to IVF. *Reprod BioMed Online*, v.23, p.245-262, 2011.
- Mapletoft RJ, Hasler JF.** Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, v.24, p.393-403, 2005.
- Moore K, Thatcher WW.** Major advances associated with reproduction in dairy cattle. *J Dairy Sci*, v.89, p.1254-1266, 2006.
- Niemann H, Wrenzycki C.** (Ed.). *Animal Biotechnology 2: Emerging Breeding Technologies*. Springer, 2018.
- Petersen, B, Niemann, H.** Molecular scissors and their application in genetically modified farm animals. *Transgenic Res*, v.24, p.381-396, 2015.
- Pinkert CA.** (ed.), *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*. Academic Press, San Diego, 2002.
- Seidel GE Jr.** Assisted reproduction with gametes and embryos: what research is needed and fundable? *Reprod Fertil Dev*, v.28, p.125-129, 2015.
- Seidel GE Jr.** Embryo transfer: the next 100 years. *Theriogenology*, v.35, p.171-180, 1991.
- Seidel GE Jr.** Lessons from reproductive technology research. *Annu Rev Anim Biosci*, v.3, p.467-87, 2015.
- Seidel GE Jr.** Update on sexed semen technology in cattle. *Animal*, v.80, p.160-164, 2014.
- Senger PL.** Pathways to pregnancy and parturition. 2.ed. Washington: Current Conceptions, 2003, 314p.
- Spemann H, Mangold H.** Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Archiv Für Mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik*, v.100, p.599-638, 1924.
- Tagarelli A, Piro A, Lagonia P, Tagarelli G, Hans Spemann.** One hundred years before the birth of experimental embryology. *Anat Histol Embryol*, v.33, p.28-32, 2004.
- Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF.** (Ed.). *Reproduction in Mammals and Man*. Paris: Ellipses, 1993. pp.503-29.
- Thibier M.** The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reprod Nutr Dev*, v.45, p.235-242, 2005.
- Cibelli J, Wilmut I, Jaenisch R, Gurdon J, Lanza R, West M, Campbell K.** (Eds). *Principles of cloning*, 2nd. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, p.572, 2013.
- Youngquist RS, Threlfall WR.** (Ed). *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 2nd. Missouri: Saunders Elsevier, 2006.
- Youngquist RS, Threlfall WR.** (Ed). *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Theriogenology. 2nd. Saint Louis: Elsevier-Saunders, 2006.