

Uso de hormônio folículo estimulante recombinante (rFSH) na produção de embriões em bovinos

Use of recombinant human follicle stimulating hormone (rhFSH) for embryo production in cattle

Romany Louise Ribeiro Gonçalves¹, Letícia Prates Martins¹, Luany Alves Galvão Martinhão¹,
Rodrigo Martins de Moura¹, Ricardo Alaminio Figueiredo², Carlos Antônio de Carvalho
Fernandes³, João Henrique Moreira Viana^{1,2*}

¹Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil, ²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil,

³Universidade de Alfenas, Alfenas, MG, Brasil

Resumo

O hormônio folículo estimulante (FSH) possui papel central no controle do desenvolvimento, maturação e esteroidogênese folicular, e tem sido amplamente utilizado na produção de embriões *in vivo* e *in vitro* em bovinos. As principais formulações de FSH disponíveis comercialmente para uso em animais de produção são obtidas por purificação de macerados de hipófise suína (pFSH). Esta fonte de FSH apresenta limitações importantes, como maior risco biológico, contaminação por hormônio luteinizante e baixa padronização entre partidas. Uma alternativa ao uso do pFSH é o FSH produzido pela tecnologia do DNA recombinante (rFSH). Trabalhos recentes demonstram que o rFSH pode ser utilizado com sucesso na indução da superestimulação e superovulação em fêmeas bovinas. Adicionalmente, formulações de rFSH de longa ação possibilitam o tratamento com uma única injeção do hormônio. O rFSH pode ser também utilizado na preparação de doadoras para a aspiração folicular, visando otimizar o número e qualidade dos oócitos recuperados. Por fim, o rFSH é uma alternativa para a maturação de oócitos *in vitro*, resultando em taxas de clivagem e blastocistos semelhantes às obtidas com pFSH. Contudo, devido às diferenças nas diversas moléculas recombinantes disponíveis, o uso de produtos a base de rFSH deve ser previamente validado para cada categoria e raça animal.

Palavras-chave: Crescimento folicular, gonadotrofinas, produção *in vitro* de embriões, superestimulação, superovulação.

Abstract

Follicle stimulating hormone (FSH) plays a central role in controlling follicular development, maturation, and steroidogenesis, and has been widely used for in vivo and in vitro embryo production in cattle. The main commercially available FSH formulations used in farm animals, however, are obtained by purification of porcine pituitary macerates (pFSH). This source of FSH has important limitations, such as greater biological risk, contamination by luteinizing hormone, and low standardization between batches. An alternative to the use of pFSH is FSH produced by recombinant DNA technology (rFSH). Recent studies demonstrate that rFSH can be successfully used to induce superstimulation and superovulation in female cattle. Additionally, long-acting rFSH formulations allow treatments based on a single injection of the hormone. The rFSH can also be used in the preparation of donors for follicular aspiration, aiming at optimizing the number and quality of the oocytes recovered. Finally, rFSH is an alternative for in vitro oocyte maturation, resulting in cleavage and blastocyst rates similar to those obtained with pFSH. However, due to the differences in the various recombinant molecules available, the use of rFSH-based products must be previously validated for each category and animal breed.

Keywords: Follicular growth, gonadotropins, in vitro embryo production, superstimulation, superovulation.

Introdução

O hormônio folículo estimulante (FSH) é uma gonadotrofina produzida na hipófise anterior e que atua diretamente no controle e regulação do funcionamento das gônadas. Nas fêmeas, este hormônio atua diretamente nas células da granulosa, regulando o crescimento, maturação e esteroidogênese folicular. Ao longo do seu desenvolvimento, os folículos ovarianos tornam-se sensíveis e, posteriormente, dependentes

*Correspondência: henrique.viana@embrapa.br

Recebido: 15 de agosto de 2024

Aceito: 23 de novembro de 2025

do estímulo pelo FSH (van den Hurk & Zhao 2005). Na ausência desta gonadotrofina, o crescimento folicular é interrompido na fase antral e os folículos entram em atresia (Jimenez-Krassel *et al.* 2018), resultando em condição anovulatória (Wiltbank *et al.* 2002).

Dado o papel central do FSH no controle do desenvolvimento folicular, este hormônio tem sido amplamente utilizado em diferentes tecnologias de reprodução assistida (*Assisted Reproductive Technologies*, ART), tanto na medicina humana quanto na veterinária. Para animais de produção, as principais formulações de FSH disponíveis comercialmente são obtidas por purificação de macerados de hipófise suína (FSH porcino ou pFSH) (Lynch *et al.* 1988). O pFSH vem sendo usado a décadas na estimulação exógena do crescimento folicular em bovinos e pequenos ruminantes (Bó & Mapletoft 2014), e ainda é a principal formulação deste hormônio disponível comercialmente para uso em grandes animais. Contudo, esta fonte de FSH apresenta limitações importantes, particularmente relacionadas ao risco biológico intrínseco ao uso de extratos de origem animal (Banerjee *et al.* 2024), à contaminação por hormônio luteinizante (LH) (Lynch *et al.* 1988), e à baixa padronização entre partidas (Murphy *et al.* 1984), o que acarreta inconsistência de resultados.

Uma alternativa ao uso de hormônios naturais são os análogos sintetizados em laboratório ou produzidos pela tecnologia do DNA recombinante. O FSH é uma glicoproteína formada por duas cadeias polipeptídicas (alfa e beta) com radicais glicosilados (Ben-Menahem 2018). Dada a complexidade de sua estrutura e, particularmente, à necessidade de glicosilação para que o hormônio tenha atividade biológica, o FSH precisa ser produzido por células eucarióticas. Isso pode ser feito pela inserção do gene da espécie de interesse em células de linhagens comerciais, que podem então ser cultivadas em biorreatores, possibilitando a obtenção do hormônio recombinante em escala. Além do baixo risco biológico e da alta padronização resultante do processo, o gene do hormônio recombinante pode ainda ser redesenhado para otimizar alguma característica específica, como a biopotência ou a meia-vida (Ben-Menahem 2018). Existem hoje no mercado, por exemplo, formulações de FSH recombinante (rFSH) de longa duração, destinadas ao uso com uma única aplicação (Fusi *et al.* 2020).

Devido às vantagens citadas acima, na medicina humana o hMG (*human menopause gonadotropin*), extrato com alta concentração de FSH obtido da urina de mulheres na menopausa e utilizado em ciclos de reprodução assistida, foi gradativamente substituído pelo FSH recombinante humano - rhFSH (Palagiano *et al.* 2004; Pacchiarotti *et al.* 2016; Lunenfeld *et al.* 2019). Atualmente, o rhFSH tornou-se o fármaco padrão para a indução da estimulação ovariana em mulheres (Budani *et al.* 2024). Em animais de produção, por outro lado, o custo de produção dos hormônios recombinantes limitou, durante muito tempo, seu uso em escala comercial. Este cenário, contudo, vem mudando nos últimos anos. Durante a pandemia, houve um aumento significativo nos preços internacionais de proteína animal, o que alavancou o investimento em genética e, consequentemente, o uso de biotécnicas de reprodução animal, incluindo a transferência de embriões (Viana 2021). A demanda de mercado, por sua vez, reverteu a tendência observada até então de redução no uso de superovulação, e a produção de embriões *in vivo* vem aumentando desde 2020, inclusive no Brasil (Viana 2023). Paralelamente, houve uma redução na oferta de pFSH, o que, combinado com o aumento da demanda, resultou em elevação acentuada de preços e, em alguns casos, até em desabastecimento. Este cenário estimulou a busca por alternativas ao pFSH, e alavancou o interesse pelo uso dos hormônios recombinantes na reprodução animal.

O uso de rFSH na superestimulação ovariana e superovulação

O número de folículos que atingem o tamanho compatível com a ovulação é variável, e determina a taxa de ovulação espécie-específica (Ginther 2016). Em espécies que têm fisiologicamente uma ou poucas ovulações por ciclo, o folículo que se estabelece como dominante em cada onda causa, pela produção de inibina e estradiol, a redução na concentração circulante de FSH endógeno, determinando a atresia dos folículos subordinados (Ginther *et al.* 1998). Este mecanismo, contudo, pode ser contornado pela administração exógena de FSH, criando condições para que múltiplos folículos cresçam além do diâmetro associado à divergência, processo conhecido como **superestimulação** ovariana. Em condições adequadas (redução da concentração circulante de progesterona subsequente à luteólise ou remoção de fontes exógenas, e consequente aumento da frequência e amplitude dos pulsos de LH), pode ocorrer a ovulação desses múltiplos folículos, ou seja, a **superovulação**.

A indução da superovulação e subsequente coleta e transferência dos embriões (*Multiple Ovulation and Embryo Transfer*, MOET) é uma biotécnica de segunda geração (Thibier 2005) utilizada comercialmente desde a década de 1970 e que respondeu, até 2017, pela maioria dos embriões bovinos

produzidos no mundo (Viana 2018). Todavia, e a despeito do grande número de pesquisas nesta área, a média mundial de embriões obtidos por coleta (cerca de 5 a 6) não aumentou nas últimas décadas (Viana 2023). De fato, a superovulação é caracterizada por grande variabilidade de resultados, com cerca de 1/3 das doadoras produzindo 2/3 do total de embriões, enquanto uma proporção equivalente não responde ao tratamento. Ainda que diversos fatores afetem o resultado da superovulação, a resposta ovariana ao FSH ainda é a principal fonte de variação no processo (Mikkola *et al.* 2019).

O pFSH tem sido amplamente utilizado em tecnologias de reprodução assistida para indução exógena do crescimento folicular, inclusive na superestimulação e superovulação (Bó & Mapletoft 2014). Contudo, o rFSH pode ser uma alternativa para reduzir as inconsistências observadas nos resultados da superovulação induzida com pFSH. Estudos recentes demonstram que o FSH recombinante bovino (rbFSH) (Gutiérrez-Reinoso *et al.* 2022, 2023), ovino (roFSH) (Sanderson & Martinez 2020) e até humano (rhFSH) (Khodadadi *et al.* 2022) podem ser utilizados na indução da superestimulação e superovulação em fêmeas bovinas, com resultados equivalentes aos obtidos com o pFSH, inclusive em raças zebuínas (Viana *et al.* 2024). Nestes trabalhos, o uso do rFSH resultou em resposta ovariana e em produção de embriões totais e viáveis semelhante (Khodadadi *et al.* 2022; Sanderson & Martinez 2020) ou eventualmente superior (Gutiérrez-Reinoso *et al.* 2022, 2023; Viana *et al.* 2024) à obtida com o pFSH.

Além da inconsistência de resultados, o pFSH tem $\frac{1}{2}$ vida inferior a 5h (Laster *et al.* 1972), e a manutenção de concentrações circulantes necessárias para estimular o crescimento de múltiplos folículos requer aplicações a cada 12h. Desta forma, o protocolo padrão de superovulação em bovinos exige oito injeções de FSH, fora os hormônios utilizados para sincronização de onda e indução de luteólise e ovulação (Bó & Mapletoft 2014). As sucessivas aplicações de hormônios exigem o manejo intensivo das doadoras e acabam sendo uma fonte importante de estresse, especialmente em raças zebuínas. Recentemente, foram desenvolvidas formulações de rbFSH e rhFSH de longa ação, e que possibilitam a indução da superovulação com uma única injeção do hormônio (Gutiérrez-Reinoso *et al.* 2023; Viana *et al.* 2024).

É importante observar que, além de recentes, os trabalhos com superovulação em bovinos utilizando rFSH utilizaram uma diversidade de moléculas, com consequente variação em atividade biológica, imunogenicidade e meia-vida. Desta forma, ainda que demonstrem a possibilidade do uso de moléculas recombinantes na estimulação do crescimento folicular, é necessário cautela na comparação e, principalmente, na extrapolação dos resultados para outras raças e categorias animais.

O rFSH na produção *in vitro* de embriões (PIVE)

A produção *in vitro* de embriões é uma biotecnologia de 3ª geração (Thibier 2005), cujo uso tem crescido de forma acentuada nas últimas duas décadas em todo mundo, não apenas em bovinos, mas também em ovinos, caprinos e equinos (Viana 2023). O processo envolve a recuperação dos complexos *cumulus*-oócito (CCO) a partir de ovários obtidos em abatedouro ou coletados de doadoras vivas por aspiração folicular orientada por ultrassonografia (*ovum pick-up*, OPU) ou laparoscopia (LOPU), e a subsequente produção dos embriões em laboratório (PIVE).

No caso da coleta de CCO por OPU ou LOPU, é possível realizar o procedimento em um momento aleatório do ciclo e, portanto, sem o conhecimento prévio do estágio de desenvolvimento ou atresia dos folículos, semelhante ao que ocorre com ovários obtidos em abatedouros. Contudo, para otimizar o número e qualidade dos CCO recuperados, é possível sincronizar a emergência da onda e estimular o crescimento folicular antes da aspiração. O pFSH e a gonadotrofina coriônica equina (eCG) têm sido muito utilizados na pré-estimulação de doadoras de oócitos (Viana 2023), particularmente em animais de raças taurinas ou pré-púberes (Baldassarre *et al.* 2018). Além do efeito direto do FSH sobre a qualidade oocitária, o uso da pré-estimulação facilita a visualização dos folículos na imagem ultrassonográfica e aumenta a quantidade de fluido folicular aspirado, o que contribui para reduzir a turbulência no sistema de aspiração e, consequentemente, o desnudamento dos CCO (Viana & Bols 2005).

Um inconveniente do pFSH nos protocolos de pré-estimulação é a necessidade de múltiplas aplicações do hormônio, em decorrência da sua baixa meia-vida. A eCG tem meia vida mais longa e poderia ser usada no lugar do pFSH, porém apresenta o mesmo problema de variação na atividade biológica entre partidas e resultados frequentemente contraditórios. As formulações de rFSH de longa duração são uma alternativa ao pFSH e à eCG para aumentar a consistência e a duração do efeito foliculo-estimulante. Resultados do nosso grupo demonstram que uma única aplicação de rhFSH em fêmeas bovinas mantém concentrações plasmáticas elevadas por até 11 dias (Viana *et al.* 2024), possibilitando a OPU até 96h após o tratamento (Moura *et al.* 2025).



Os CCO obtidos na OPU ou LOPU são posteriormente utilizados na PIVE, processo subdividido nas etapas de maturação *in vitro* (MIV) e fecundação *in vitro* (FIV) dos oócitos e cultivo *in vitro* (CIV) dos zigotos. Na MIV, o FSH é normalmente adicionado ao meio de maturação, visando estimular as etapas finais da maturação dos oócitos e a expansão das células do *cumulus*. Ainda que em algumas espécies a expansão do *cumulus* não seja essencial para a posterior fecundação do oócito (Redel et al. 2021), a adição de FSH nos meios de MIV promove a captação de glicose e produção de lactato pelo oócito, favorece o reinício da meiose e aumenta as taxas de blastocistos subsequentes (Van Tol et al. 1996; Sutton-McDowall et al. 2012). Formulações de rhFSH já são utilizadas como rotina na MIV em humanos (Wang et al. 2014), e vêm sendo utilizadas também na MIV em bovinos (Luciano et al. 2011), ovinos (Marco-Jimenez 2014) e caprinos (Ferreira et al. 2020). Em bovinos, estudos recentes demonstram que o rhFSH pode ser utilizado com sucesso na substituição do pFSH em rotinas comerciais de produção de embriões, resultando em taxas semelhantes de clivagem, de blastocistos e de gestações subsequentes (Martins et al. 2023).

Conclusões

A substituição de produtos obtidos de fonte animal por análogos sintéticos ou semi-sintéticos é uma tendência generalizada, e que abrange de diluidores de sêmen ao soro fetal utilizado no cultivo de células e embriões. No caso dos hormônios não é diferente, e há uma demanda crescente para a substituição do pFSH e da eCG por versões recombinantes. Os resultados preliminares obtidos por diferentes grupos de pesquisa sugerem que o rFSH pode ser utilizado com sucesso na produção de embriões em ruminantes, tanto em processos *in vitro* como *in vivo*, estimulando a função das células da granulosa e promovendo o crescimento, maturação e esteroidogênese folicular. Contudo, como cada formulação recombinante pode apresentar diferenças na farmacodinâmica e farmacocinética, não é possível fazer inferências diretas quanto ao protocolo de uso baseado nos resultados com o pFSH. Desta forma, o uso do rFSH deve ser previamente validado para cada categoria e raça animal, e efeito pretendido.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) Projeto #00193-00002307/2022-11, e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da UNB pelo apoio financeiro.

Referências

- Baldassarre H, Currin L, Michalovic L, Bellefleur AM, Gutierrez K, Mondadori RG, Glanzner WG, Schuermann Y, Bohrer RC, Dicks N, Lopez R, Grand FX, Vigneault C, Blondin P, Gourdon J, Bordignon V. Interval of gonadotropin administration for *in vitro* embryo production from oocytes collected from Holstein calves between 2 and 6 months of age by repeated laparoscopy. *Theriogenology* 2018; 116:64-70. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.005>.
- Banerjee G, Farmer SF, Hyare H, Jaunmuktane Z, Mead S, Ryan NS, Schott JM, Werring DJ, Rudge P, Collinge J. Iatrogenic Alzheimer's disease in recipients of cadaveric pituitary-derived growth hormone. *Nat Med*. 2024;30(2):394-402. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02729-2>.
- Ben-Menahem D. Preparation, characterization and application of long-acting FSH analogs for assisted reproduction. *Theriogenology* 2018; 112:11-17. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.08.020>.
- Bó GA, Maplettoft RJ. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology* 2014;81(1):38-48. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.020>.
- Budani MC, Fensore S, DI Marzio M, Tiboni GM. An updated meta-analysis comparing the efficacy and safety of biosimilar medicinal products to the original follitropin alfa. *Minerva Obstet Gynecol* 2024;76(1):70-79. <https://doi.org/10.23736/S2724-606X.22.05175-2>.
- Ferreira ACA, Sá NAR, Cadenas J, Correia HHV, Guerreiro DD, Alves BG, Lima LF, Celestino JJH, Rodrigues APPR, Gastal EL, Figueiredo JR. Pituitary porcine FSH, and recombinant bovine and human FSH differentially affect growth and relative abundances of mRNA transcripts of preantral and early developing antral follicles in goats. *Anim Reprod Sci* 2020; 219:106461. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106461>.



- Fusi FM, Zanga L, Arnoldi M, Melis S, Cappato M, Candeloro I, Di Pasqua A.** Corifollitropin alfa for poor responders patients, a prospective randomized study. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020;18(1):67. doi: 10.1186/s12958-020-00628-6.
- Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K.** Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle. *Theriogenology.* 1998;50(4):507-19. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(98\)00157-5](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00157-5).
- Ginther OJ.** The theory of follicle selection in cattle. *Domest Anim Endocrinol.* 2016;57:85-99. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.06.002>.
- Gutiérrez-Reinoso MA, Aguilera CJ, Navarrete F, Cabezas J, Castro FO, Cabezas I, Sánchez O, García-Herreros M, Rodríguez-Alvarez L.** Effects of Extra-Long-Acting Recombinant Bovine FSH (bscrFSH) on Cattle Superovulation. *Animals (Basel).* 2022;12(2):153. <https://doi.org/10.3390/ani12020153>.
- Gutiérrez-Reinoso MA, Arreseigor CJ, Driedger B, Cabezas I, Hugues F, Parra NC, Sánchez O, Toledo JR, García-Herreros M.** Effects of recombinant FSH (bscrFSH) and pituitary FSH (FSH-p) on embryo production in superovulated dairy heifers inseminated with unsorted and sex-sorted semen. *Anim Reprod Sci.* 2023;252:107226. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107226>.
- Jimenez-Krassel F, Ireland JLH, Kronmeyer C, Wilson-Alvarado A, Ireland JJ.** Development of the "waveless" bovine model. *Anim Reprod Sci* 2018; 195:80-88. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.05.009>.
- Khodadadi A, Niasari-Naslaji A, Nikjou D, Mohammadi B.** Superovulation of high-producing Holstein lactating dairy cows with human recombinant FSH and hMG. *Theriogenology* 2022;191:239-244. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.08.010>.
- Laster D.** Disappearance of and uptake of I125 FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *J Reprod Fertil* 1972;30:407-15.
- Luciano AM, Franciosi F, Modina SC, Lodde V.** Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism(s). *Biol Reprod.* 2011;85(6):1252-9. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.092858>.
- Lunenfeld B, Bilger W, Longobardi S, Alam V, D'Hooghe T, Sunkara SK.** The Development of Gonadotropins for Clinical Use in the Treatment of Infertility. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:429. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00429>.
- Lynch SS, Reay P, Bluck M.** The extraction and purification of human pituitary follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Acta Endocrinol Suppl* 1988;288:12-9.
- Marco-Jiménez F, Vicente JS, Viudes-de-Castro MP.** Effect of lanosterol on the in vitro maturation in semi-defined culture system of prepubertal ewe oocytes. *Zygote* 2014;22(1):50-7. <https://doi.org/10.1017/S096719941100044X>.
- Martins LP, Martinhão LAG, Garcia IN, Ribas DN, Grázia JGV, Faria AOC, Figueiredo RA, Viana JHM.** Effect of follicle-stimulating hormone source used during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes on embryo production and morphological quality. *Reproduction, Fertility and Development* 2023, 35(2):173-174. <https://doi.org/10.1071/RDv35n2Ab94>
- Mikkola M, Hasler JF, Taponen J.** Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle. *Reprod Fertil Dev* 2019;32(2):104-124. <https://doi.org/10.1071/RD19279>.
- Moura RM, Fernandes CAC, Siqueira LGB, Figueiredo RA, Martins CF, Peixer MAS, Xavier MC, Viana JHM.** Ovarian stimulation of Nelore calves and prepubertal heifers with a long-acting recombinant human FSH (corifollitropin- α) and subsequent ovum pick-up and in vitro embryo production outcomes. *Theriogenology* 2025; 234:110-116. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.12.011>.
- Murphy B, Mapletoft R, Manns J, Humphrey W.** Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology* 1984; 21:117-125.
- Pacchiarotti A, Selman H, Valeri C, Napoletano S, Sbracia M, Antonini G, Biagiotti G, Pacchiarotti A.** Ovarian Stimulation Protocol in IVF: An Up-to-Date Review of the Literature. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016;17(4):303-15. <https://doi.org/10.2174/1389201017666160118103147>.
- Palagiano A, Nesti E, Pace L.** FSH: urinary and recombinant. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004;115 Suppl 1:S30-3. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2004.01.023>.
- Redel BK, Spate LD, Yuan Y, Murphy CN, Roberts RM, Prather RS.** Neither gonadotropin nor cumulus cell expansion is needed for the maturation of competent porcine oocytes in vitro†. *Biol Reprod.* 2021;105(2):533-542. <https://doi.org/10.1093/biolre/iaob090>.



-
- Sanderson N, Martinez M.** A single administration of a long-acting recombinant ovine FSH (roFSH) for cattle superovulation. *Theriogenology*. 2020;154:66-72. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.037>.
- Sutton-McDowall ML, Mottershead DG, Gardner DK, Gilchrist RB, Thompson JG.** Metabolic differences in bovine cumulus-oocyte complexes matured in vitro in the presence or absence of follicle-stimulating hormone and bone morphogenetic protein 15. *Biol Reprod*. 2012;87(4):87. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.102061>.
- Thibier M.** The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reprod Nutr Dev*. 2005;45(3):235-42. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005016>.
- van den Hurk R, Zhao J.** Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 2005;63(6):1717-51. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.005>.
- van Tol HT, van Eijk MJ, Mummery CL, van den Hurk R, Bevers MM.** Influence of FSH and hCG on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. *Mol Reprod Dev*. 1996;45(2):218-24. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199610\)45:2<218::AID-MRD15>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199610)45:2<218::AID-MRD15>3.0.CO;2-X).
- Viana JHM, Bols PEJ.** Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos cumulus-oócito por aspiração folicular. *Acta Scientiae Veterinariae* 2005, 33 (Supl 1): 1-4.
- Viana JHM.** 2017 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: is it a turning point? *Embr Tech Newsl* 2018; 36:8-25.
- Viana JHM.** 2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: World embryo industry grows despite the Pandemic. *Embr Tech Newsl* 2021; 39:24-38.
- Viana JHM.** 2022 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: The main trends for the world embryo industry still stand. *Embr Tech Newsl* 2023; 41:20-38.
- Viana JHM, Moura RM, Martins LP, Figueiredo RA, Siqueira LGB, Fernandes CAC.** Superovulating cattle with corifollitropin-alpha, a long-acting recombinant human FSH (rhFSH): Dose-response, half-life, effects on the ovaries, and embryo outcomes. *Theriogenology* 2024; 226:302-307. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.06.033>.
- Wang X, Tsai T, Qiao J, Zhang Z, Feng HL.** Impact of gonadotropins on oocyte maturation, fertilisation and developmental competence in vitro. *Reprod Fertil Dev* 2014;26(5):752-7. <https://doi.org/10.1071/RD13024>.
- Wiltbank MC, Gümen A, Sartori R.** Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*. 2002;57(1):21-52. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00656-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00656-2).
-