



Transporte-maturação de oócitos bovinos em palhetas

Transport-maturation of bovine oocytes in straws

Janaína Vanuci Tessmann¹, Fabrício Desconzi Mozzaquatro¹, Lucio Pereira Rauber¹,
Márcia Vendrusculo dos Santos², Ricardo Monteiro Chequim², Mari Lourdes Bernardi³,
Carlos Antonio Mondino Silva⁴ & Mara Iolanda Batistella Rubin⁴

RESUMO

A demanda pela aspiração folicular associada à produção *in vitro* de embriões, no Brasil, aumentou com o objetivo de acelerar o ganho genético do rebanho bovino. A técnica, no entanto, apresenta limitações, especialmente relacionadas ao tempo e às condições de transporte dos oócitos até o laboratório. Para avaliar o uso de palhetas de 0,25mL no transporte-maturação simulado, complexos *cumulus*-oócitos (CCO) de vacas de frigorífico foram maturados *in vitro*. No experimento I, efetuou-se a maturação em meio TCM-199, em placas de 4 poços, em estufa a 38,5°C, 5% CO₂, por 24h (grupo controle) e em palhetas, em meio TCM-Hepes, mantidas por 6h em banho-maria (grupo BM) ou garrafa térmica (grupo T), a 38,5°C. Nestes dois grupos, a maturação foi completada em placas, por 18h, nas mesmas condições do grupo controle. No experimento II, simulou-se o transporte em palhetas, em meio TCM-Hepes, a 38,5°C, por 24h, em estufa (grupo palheta). O grupo controle foi semelhante ao do experimento I. A fecundação (=D0) foi efetuada em meio TALP-Fert, por 18h, e o cultivo foi efetuado em meio SOFaaci, por 8 dias, em ambos os experimentos. As taxas de blastocistos em D7, no experimento I, foram semelhantes (P>0,05) para os grupos controle (31%; 97/312), BM (21%; 64/301) e T (31%; 94/298). No experimento II, não houve diferença (P>0,05) nas taxas de blastocistos em D7 entre os grupos controle (30%; 44/145) e palheta (20%; 29/139). O número de células dos blastocistos eclodidos não diferiu entre os grupos, em ambos os experimentos (P>0,05). As palhetas ofereceram condições seguras e práticas para o transporte-maturação de CCO em TCM-Hepes, em garrafa térmica a 38,5°C, por 6h. Portanto, sua aplicação é possível nos programas de aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões bovinos.

Descritores: bovinos, palhetas, Hepes, transporte, PIV.

ABSTRACT

The interest for bovine ovum pick-up associated with the embryo *in vitro* production process in Brazil is growing, seeking a fast genetic improvement of the herd. However, the whole procedure shows limitations especially regarding time and conditions for the transport of oocytes. To evaluate the use of 0.25mL straws during the transport-maturation process, *cumulus*-oocyte complexes (COC) obtained from slaughtered cows were selected for *in vitro* maturation. In experiment I, the maturation was performed in 4-well dishes, with TCM-199 medium, in an incubator with 5% CO₂, at 38.5°C, for 24h (control group) and into 0.25mL straws containing TCM-Hepes medium, maintained in water bath (BM group) or in a thermo bottle (T group) at 38.5°C, for 6h. In these two groups, maturation was completed in 4-well dishes, for 18h, in the same conditions of the control group. In experiment II, the transport-maturation was simulated in straws with TCM-Hepes medium, at 38.5°C, in an incubator, for 24h (straw group). The control group was similar to that described for experiment I. The fertilization (Day 0) was accomplished in TALP-FERT for 18h and the culture in SOFaaci medium, for 8 days, in both experiments. In experiment I, blastocyst rates at D7 were similar (P>0.05) for control (31%; 97/312), BM (21%; 64/301) and T (31%; 94/298) groups. In Experiment II, no differences (P>0.05) were observed between control (30%; 44/145) and straw (20%; 29/139) groups. Embryo cell number of hatched blastocysts was similar between groups, in both experiments (P>0.05). The straws offered a safe and practical method for bovine oocyte transport in TCM-Hepes, in thermo bottles, at 38.5°C, for 6h. Therefore, its application is possible in programs of oocyte aspiration and *in vitro* embryo bovine production.

Key words: bovine, straws, Hepes, transport, PIV.

INTRODUÇÃO

A aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-som (OPU), associada à produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV), permite que oócitos imaturos de vacas de alto mérito genético gerem embriões viáveis à transferência. A OPU/PIV, difundida mundialmente, ocupa no mercado agropecuário brasileiro uma posição de destaque. A empresa que mais emprega esta tecnologia comercialmente está sediada no Brasil [2].

O material genético da fêmea, os Complexos *Cumulus*-Oócitos (CCO), são sensíveis às variações de temperatura e pH. A longa distância entre as fazendas e os laboratórios de produção é um entrave para o transporte de CCO recuperados de doadoras vivas por OPU e tem sido objeto de várias pesquisas [3, 8, 14, 23,29,30]. A maturação *in vitro* é efetuada em estufa de cultivo com 5% de CO₂ em ar, em meios com bicarbonato que promovem o controle do pH [9]. Por outro lado, quando não se tem atmosfera gasosa controlada, deve-se adicionar um tampão orgânico como o HEPES [29,30]. Uma alternativa para a manutenção dos CCO é em líquido folicular bovino [14,23,25] ou equino [22]. O transporte de CCO já foi testado em tubos de 4mL [5], em estufa portátil [5,27], em placas mantidas em bolsas plásticas e gaseificadas [20], em tubos *Eppendorff* de 1,5mL [28], criotubos de 1mL [12] e tubos de poliestireno gaseificados mantidos em banho-maria [13,15,17]. Em bubalinos, o trans-

porte de CCO foi testado em tubos *Falcon*, em incubadora portátil [16]. O fato das palhetas serem de baixo custo e de fácil manipulação levou-nos a avaliar o modelo de 0,25mL para o transporte-maturação de CCO em TCM-HEPES, por 6h, em garrafa térmica ou banho-maria a 38,5°C e, por 24h, em estufa, sem controle da atmosfera gasosa.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e seleção dos Complexos *Cumulus*-Oócitos (CCO)

Ovários bovinos provenientes de frigorífico foram transportados ao laboratório, à temperatura inicial de 30°C, em solução fisiológica (0,9% de NaCl¹), com 50mg/L de estreptomicina¹ e 100.000UI/L de penicilina G-Potássica¹. No laboratório, os mesmos foram lavados em álcool 70°GL e, em seguida, duas vezes em solução fisiológica. Os folículos (diâmetro 2 a 8mm) foram puncionados com agulha 21G conectada a uma bomba de vácuo² e os CCO recuperados foram mantidos em líquido folicular para identificação sob lupa estereomicroscópica³. Imediatamente após, foi realizada a seleção dos CCO pelo aspecto morfológico [6]. Antes de iniciar as rotinas deste estudo, efetuou-se o controle da temperatura da água em uma garrafa térmica, recipiente utilizado para o transporte-simulado dos complexos *cumulus*-oócitos, no decorrer do tempo (Figura 1).

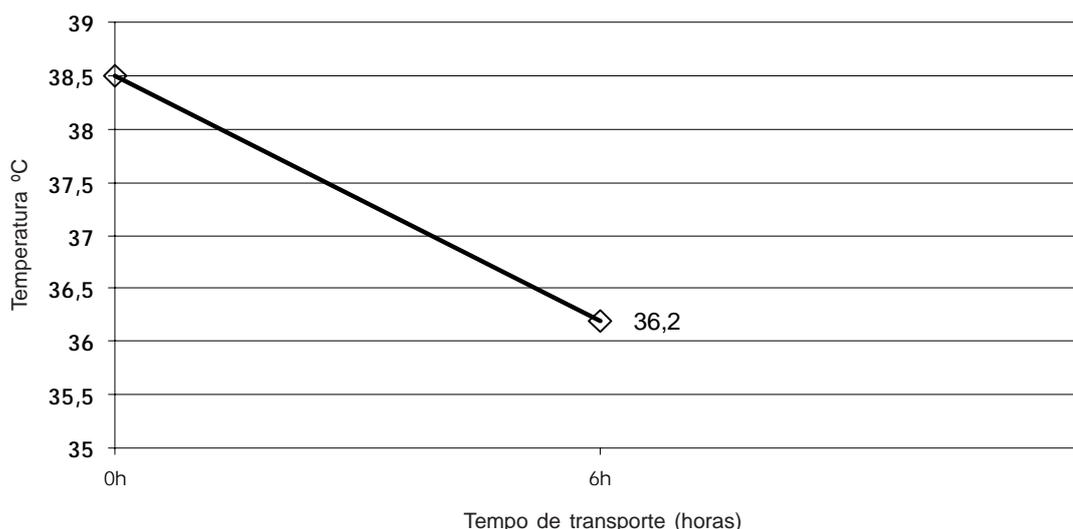


Figura 1. Curva de temperatura da garrafa térmica utilizada no transporte-maturação simulado de Complexos *cumulus*-oócitos (CCO) bovinos em palhetas de 0,25mL, por 6 horas.

Maturação *in vitro* (MIV)

Em ambos experimentos, os CCO foram distribuídos aleatoriamente nos tratamentos. Os CCO do grupo controle (C) foram lavados 5 vezes em meio TCM-Hepes com TCM-199⁴ (Sais de Earle), 6,5mg/mL de HEPES (H7006¹), 0,168mg/mL de bicarbonato de sódio (S5761¹), 0,022mg/mL de piruvato de sódio (P4562¹) e 10% de soro de vaca em estro (SVE). Os CCO (20 a 30) foram maturados *in vitro*, em 400mL de TCM-199 com 3mg/mL de bicarbonato de sódio (S5761¹), 5,957mg/mL de Hepes (H6147¹) + 0,01UI de rFSHh⁵/mL e 0,5mg/mL de LH⁶, em placas de quatro poços⁷, por 24h, em estufa⁸ de cultivo, a 38,5°C com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. Os CCO dos tratamentos foram lavados e envasados com TCM-Hepes + 0,01UI de rFSHh/mL e 0,5mg/mL de LH, em palhetas⁹ de 0,25mL, com 5CCO/palheta (5 CCO:50ml de meio).

No experimento I, as palhetas permaneceram por 6h em garrafa térmica¹⁰, com água inicialmente a 38,5°C (T), ou em banho-maria a 38,5°C(BM), acondicionadas em luvas de procedimento. Após esse período, todos CCO foram retirados das palhetas, lavados 4 vezes em TCM-Hepes e maturados por 18h, nas mesmas condições dos CCO do grupo controle.

No experimento II, os CCO-Controle maturaram nas mesmas condições do grupo controle do experimento I. No grupo-Palheta, os CCO foram mantidos em palhetas, com meio TCM-Hepes+LH/FSH, para simular o transporte-maturação sem controle da atmosfera gasosa, permanecendo na estufa de cultivo por 24h, sob temperatura constante, em bolsas plásticas seladas, impermeáveis a gases.

Fecundação *in vitro* (FIV)

Concluída a maturação, em ambos experimentos, os CCO foram transferidos para 400mL de meio TALP-FERT [21] com 6mg/mL de BSA¹, 0,22mg/mL de piruvato de sódio¹ e penicilamina+hipotaurina+epinefrina (PHE¹). Este meio foi estabilizado por 2h e, após, acrescentou-se 30mg/mL de heparina¹. A FIV foi conduzida em estufa de cultivo⁷ a 38,5°C, com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada, por 18h, com sêmen congelado (1 x 10⁶ espermatozoides/mL) de um touro *Bos taurus*, preparado por migração ascendente [21].

Cultivo *in vitro*

Em ambos os experimentos, após o período de FIV, os oócitos/zigotos foram submetidos à agitação mecânica por 85 segundos, em TCM-Hepes. O cultivo foi conduzido em 400mL de meio SOFaaci - fluido sintético de oviduto [10], com 5% de soro de vaca em estro, em placas de cultivo celular com 4 poços⁷, sob óleo mineral¹, acondicionadas em bolsas com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, mantidas em estufa a 38,5°C, por 8 dias.

A maturação, fecundação e cultivo *in vitro* nos diferentes tratamentos foram conduzidos simultaneamente, mas em experimentos independentes com 13 (Experimento I) e 5 (Experimento II) repetições. Considerando-se a data da fecundação como dia zero (D0), as taxas de clivagem e de blastocistos foram avaliadas em D2 e D7, respectivamente. Em D9, foi avaliado o desenvolvimento até blastocisto expandido e eclodido. Todos os blastocistos eclodidos foram fixados em paraformaldeído a 2% e corados com Hoechst (10µL/mL), em PBS salino, para a contagem de células. A visualização foi efetuada em microscópio de epifluorescência com filtro de excitação (365nm) e de barreira (410nm).

Análise estatística

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso e cada repetição foi considerada um bloco. Os dados referentes às taxas foram submetidos à transformação raiz quadrada e somados à constante de 1,5 para uniformizar a variância das amostras. Aplicou-se o método da análise de variância, teste F e teste de Tukey, em nível de 5% de significância. Os resultados foram processados pelo programa estatístico SAS, pelo procedimento GLM [24]. Os dados da contagem de células dos blastocistos foram submetidos à transformação logarítmica, antes da análise pelo GLM. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

RESULTADOS

Foi verificado que a temperatura da água, dentro da garrafa térmica utilizada para conduzir o transporte-maturação de CCO em palhetas de 0,25mL, passou de 38,5 para 36,5°C após 6h (Figura 1).

No experimento I, as taxas de clivagem em D2 foram similares (P>0,05) para CCO mantidos em palhetas

em garrafa térmica (78,8%), banho-maria (78,7%) e grupo controle (79,5%). Os índices de blastocistos em D7 e D9, também foram semelhantes ($P>0,05$; Figura 2) entre os tratamentos e o grupo controle. O número de células embrionárias de blastocistos eclodidos ou em eclosão (Tabela 1) não foi diferente ($P>0,05$) entre os grupos controle, garrafa térmica e banho-maria.

Tabela 1. Número médio de células visualizadas por coloração fluorescente com Hoechst de blastocistos bovinos eclodidos e em eclosão, obtidos com Complexos *cumulus*-oócitos submetidos ao transporte-maturação *in vitro* em palhetas de 0,25mL, a 38,5°C por 6 horas.

Estágio embrionário	Tratamentos		
	Controle (Estufa)	Banho-maria	Garrafa-térmica
Blastocistos eclodidos	132,9 ± 45,5 (n= 37)	130,3 ± 37,9 (n= 30)	141,1 ± 50,0 (n= 38)
Blastocistos em eclosão	94,3 ± 27,0 (n= 7)	122,5 ± 35,4 (n= 6)	109,3 ± 36,1 (n= 6)

Não houve diferença entre os tratamentos ($P>0,05$).

No experimento II, não houve diferença ($P>0,05$) no percentual de clivagem (86,2 e 79,1%), de blastocistos em D7 (30,3 e 20,8%; Figura 3), nem no número de células dos blastocistos eclodidos (Tabela 2) entre o grupo controle e os CCO mantidos em palhetas, na estufa por 24h, respectivamente. A produção de blastocistos em D9 (14,4%) do grupo de CCO mantidos em palhetas foi inferior ($P<0,05$) à do grupo controle (24,8%; Figura 3).

Tabela 2. Número médio de células visualizadas por coloração fluorescente com Hoechst de blastocistos bovinos eclodidos, obtidos de Complexos *cumulus*-oócitos submetidos ao transporte-maturação *in vitro* em palhetas de 0,25mL, a 38,5°C, por 24 horas.

Estágio embrionário	Controle	Palheta 0,25mL
Blastocistos eclodidos	105,4 ± 39,3 (n= 11)	118,7 ± 27,2 (n= 4)

Não houve diferença entre os tratamentos ($P>0,05$).

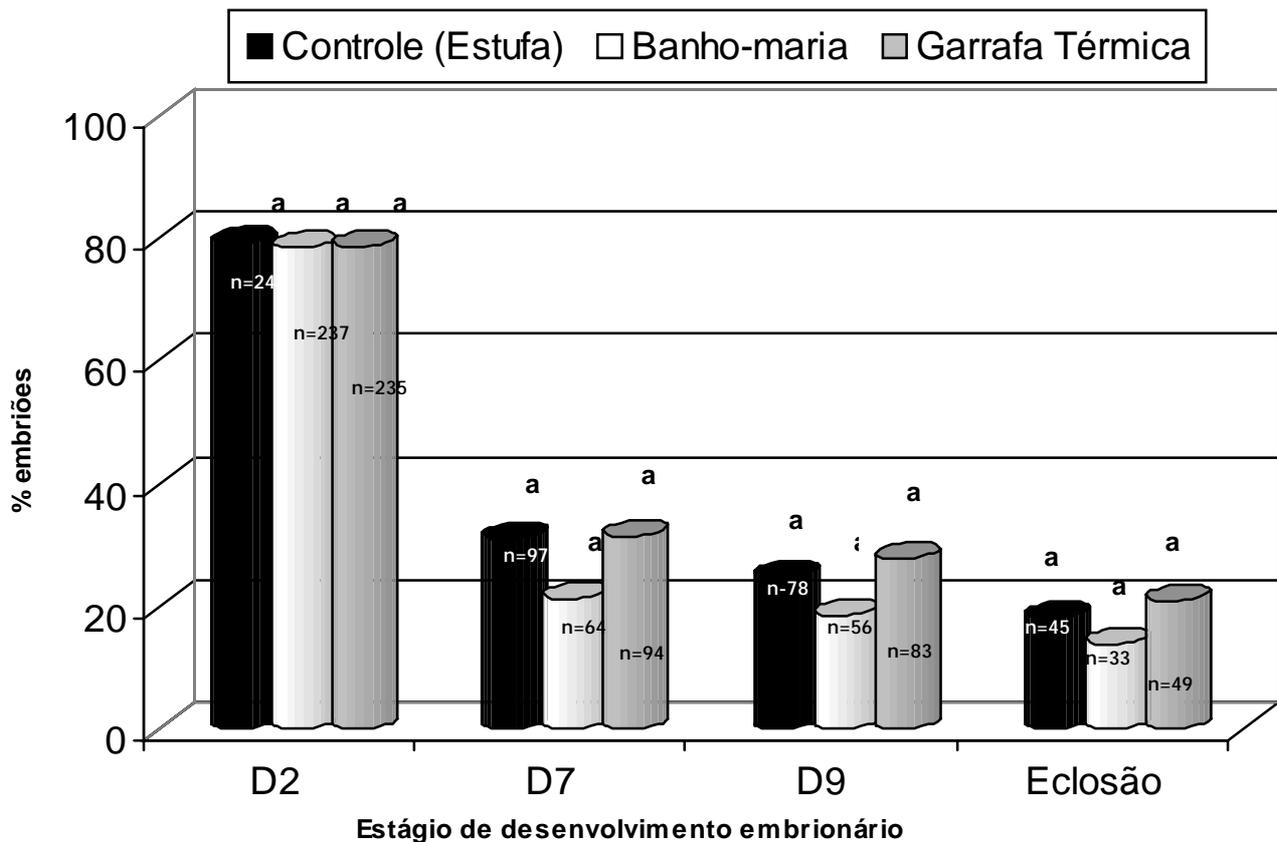


Figura 2. Produção embrionária *in vitro* com Complexos cumulus-oócitos (CCO) bovinos submetidos ao transporte-maturação simulado em palhetas de 0,25mL, por 6 horas.

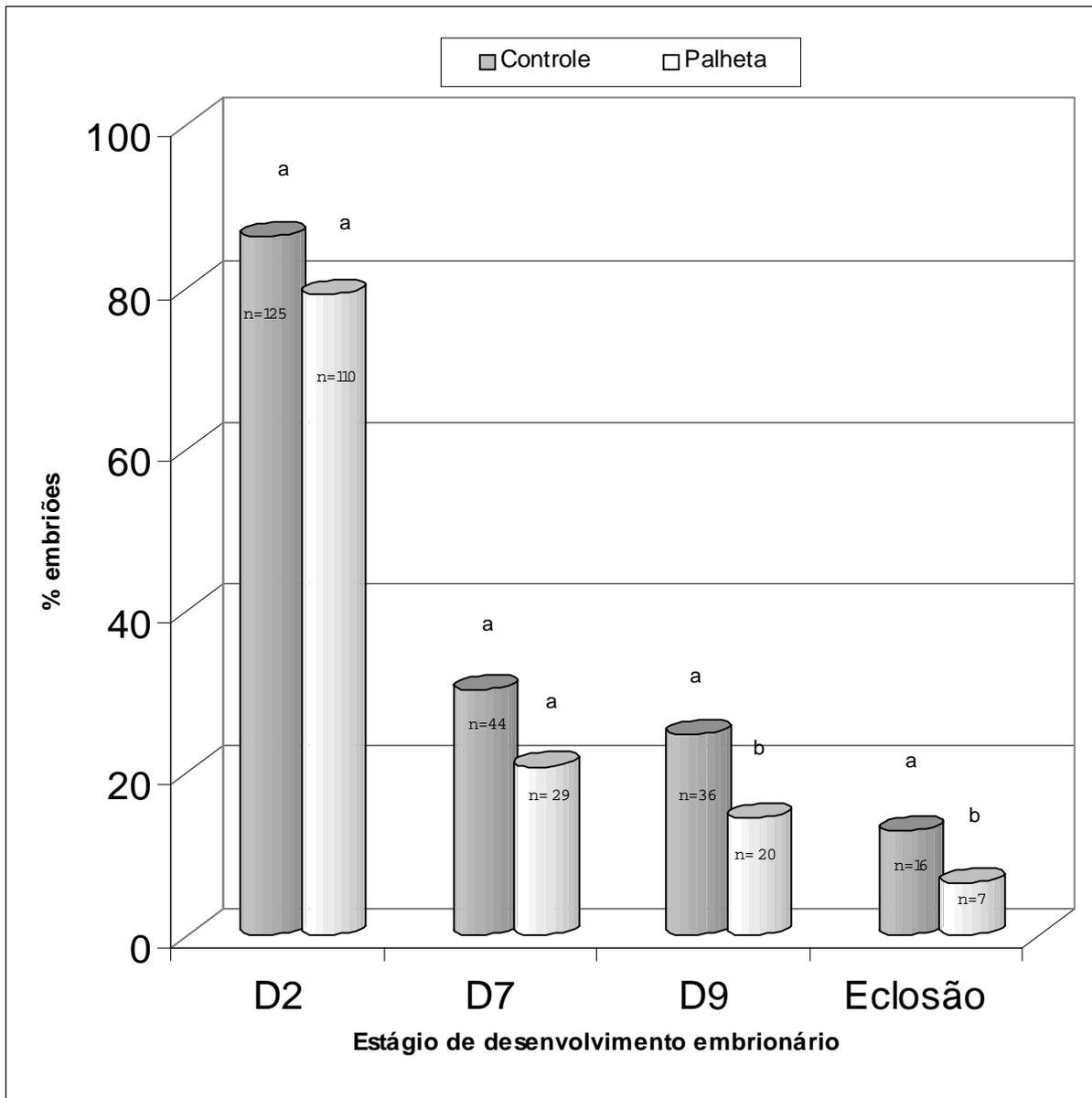


Figura 3. Produção embrionária *in vitro* com Complexos cumulus-oócitos (CCO) bovinos submetidos ao transporte-maturação simulado em palhetas de 0,25mL, por 24 horas.

DISCUSSÃO

A valorização do material genético bovino impulsionou o uso em larga escala da produção *in vivo* e *in vitro* de embriões. Um dos fatores limitantes para a OPU/PIV é a perda da qualidade dos oócitos durante o transporte. O meio e o recipiente em que os oócitos são acondicionados são fatores que influenciam na perda da qualidade.

Com o uso de palhetas de 0,25mL para transporte dos CCO em garrafa térmica, houve diminuição da temperatura de 38,5 para 36,5°C, após 6h, mas a

clivagem e produção de blastocistos manteve-se em percentuais similares aos do grupo controle (Experimento I, Figura 2). Em estudo no qual foi avaliado o efeito da temperatura sobre a produção de embriões *in vitro* [26], a partir de oócitos bovinos, foi demonstrado que a redução da mesma de 38,5°C (10h iniciais) para 37°C (14h finais) não determinou prejuízo na evolução embrionária subsequente, sugerindo que pequenas variações de temperatura durante a MIV não afetam a produção *in vitro*.

Quando o transporte de CCO é efetuado sem controle da atmosfera gasosa, procura-se minimizar

as possíveis alterações de pH do meio. O transporte de CCO em tubos de poliestireno de 1,5mL, em 400mL de TCM-Hepes, por 12h, resultou em produção de blastocistos, em D9, superior (18,4%) à observada (8,6%) após 18h [15]. Para evitar a variação de pH do meio, CCO bovinos foram maturados sem controle da atmosfera gasosa, por 24h, em tubos de poliestireno de 1mL repletos de TCM-Hepes, para reduzir o volume de ar [3]. Nesse caso, o pH do meio TCM-Hepes praticamente não variou, durante 24h, tendo passado de 7,5 para 7,4 e o desenvolvimento embrionário em D7 (38%) foi semelhante ao observado no grupo controle (36%), constituído por CCO maturados em TCM-199, em estufa com 5% CO₂. Dessa forma, o meio TCM-Hepes foi utilizado em ambos os experimentos do presente trabalho para evitar a variação de pH, durante o período de transporte simulado.

Nos programas OPU/PIV, em bovinos, é comum a necessidade de efetuar a maturação em pequenos grupos de oócitos. Embora a maturação individual de CCO em meio SOFaa, com álcool polivinílico e 10ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF) tenha permitido a obtenção de 20% de blastocistos [18], oócitos maturados *in vitro* individualmente têm, invariavelmente, sua competência oocitária comprometida, bem como o seu subsequente desenvolvimento embrionário [1,4,7,11]. Deve-se considerar a relação entre o volume de meio e o número de CCO na avaliação da produção de blastocistos. Quando grupos de 5 a 30 CCO são maturados, na proporção de 1 CCO:13mL, há aumento progressivo na produção de blastocistos, com o aumento do número de oócitos [19]. Mantendo a proporção de 1 oócito por 10mL de meio, grupos de 10 e 5 oócitos resultam em maiores taxas de blastocistos que os oócitos cultivados individualmente [29]. Em ambos os experimentos do presente estudo, foram utilizados 5 oócitos por palheta, considerado o mínimo necessário para não prejudicar a produção de blastocistos [29].

No experimento II, as taxas de clivagem e de blastocistos em D7 (Figura 3) e número de células dos blastocistos eclodidos, dos grupos controle e palheta, evidenciaram que não houve prejuízo aos CCO transportados. A obtenção de mais de 20% de blastocistos em D7, importante num programa OPU/PIV, foi obtida aqui, experimentalmente. Em D9, houve menor produção de blastocistos com os CCO maturados nas

palhetas por 24h. Mesmo que o meio TCM-Hepes não mostre variação de pH, durante 24h de maturação, em tubos de poliestireno de 1mL [3], é possível que ele não tenha sido adequado para um período tão longo de maturação, em palhetas. Se o volume reduzido de meio na palheta ou a presença das colunas de ar, vizinhas ao meio, com os oócitos na coluna central da palheta, foram responsáveis por essa diminuição, ainda resta esclarecer. Há ainda que considerar que a avaliação em D9 é usual em pesquisa enquanto que, em programas comerciais de OPU/PIV, os embriões são transferidos em D7. Assim, a ocorrência de diferenças percentuais entre as duas avaliações é discutível, pois a transferência de embriões produzidos *in vitro* é, sem exceção, efetuada antes do oitavo dia de desenvolvimento.

As palhetas de 0,25mL requerem menor volume de meio não gaseificado para acomodar os oócitos e possuem custo inferior a outros recipientes. Elas oferecem, ainda, condições seguras e práticas para o transporte/maturação de CCO em TCM-Hepes, em garrafa térmica a 38,5°C, por até 6h, para uso nos programas de aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões bovinos.

CONCLUSÕES

Palhetas de 0,25mL podem ser utilizadas para o transporte-maturação de Complexos *Cumulus*-Oócitos bovinos em TCM-Hepes, acondicionadas em garrafa térmica a 38,5°C, sem controle da atmosfera gasosa, por até 6h, sem prejuízo ao desenvolvimento embrionário *in vitro*. Adicionalmente, o transporte-maturação em meio TCM-Hepes a 38,5°C, por 24h, é viável para a produção *in vitro* de embriões bovinos.

Agradecimentos. Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann do LAMIC (UFMS) e ao Prof. José Henrique Souza da Silva (Depto. de Zootecnia, UFMS), pelo apoio à pesquisa. Ao Dr. Neimar Correa da PECPLAN-ABS, Rosário do Sul, RS, pela assistência técnica/auxílio no preparo do sêmen, aos Frigoríficos Silva (Santa Maria) e JG (Caçapava do Sul) que gentilmente cederam os ovários bovinos para este estudo.

Notas Informativas

¹Sigma Chemical CO. – P.O. Box 4508, MO., USA.

²Nevoni Equipamento Odonto Médico Hospitalar Ltda. – Rua Dom João V, 266/280 Lapa 05.075-060 São Paulo, SP, Brasil.

³Carl Zeiss – 73446, Oberkochen, Alemanha.

⁴Gibco BRL, Grand Island, N.Y. 14072, USA.

⁵Serono Pharma S.p.A. – 70123, Bari, Itália (L1930300).

⁶Lutropin - Vetrepharm Inc. London, N6M 1 A3, Ontario, Canada

⁷Nunclon, Nunc Brand Products – Postbox 280, DK-4000, Roskilde, Dinamarca.

⁸W.C. Heraeus GmbH. Postfach 1553 D-6450 Hanau 1, Alemanha.

⁹Minitüb Abfüll – und Labortechnik GmbH & Co. Hauptstrabe 41 D-84184 Tiefenbach, Alemanha.

¹⁰Sobral Invicta S/A – Industria Brasileira Al. Manuel Antônio Sobral, 701 - Distr. Industrial. 37.550-000 Pouso Alegre, MG - Brasil.

REFERÊNCIAS

- Ahern T.J. & Gardner D.K. 1998.** Culturing bovine embryos in groups stimulates blastocyst development and cell allocation to the inner cell mass. *Theriogenology*. 49:194.
- Alvarenga M.A. 2003.** A excelência do Brasil em embriões. *Informativo bimestral da Tortuga Cia Zootécnica Agrária*. Ano 49. 439: 3.
- Alves D.F. 2003.** Transporte e maturação *in vitro* de oócitos bovinos. 47f. Santa Maria, RS. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.
- Blondin P. & Sirard M.A. 1995.** Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 41: 54-62.
- Byrd S.R., Flores-Foxworth G. & Westhusin M.E. 1995.** Normal ovine embryo development following *in vitro* oocyte maturation in a portable incubator in the absence of CO₂. *Theriogenology*. 43:179.
- DeLoss F., Vanvliet C., Vanmaurik P. & Kruij T.A.M. 1989.** Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Research*. 24: 197-204.
- Fukui Y., Kikuchi Y., Kondo H. & Mizushima S. 2000.** Fertilizability and developmental capacity of individually cultured bovine oocytes. *Theriogenology*. 53:1553-1565.
- Galli C., Crotti G., Notari C., Turini P., Duchi R. & Lazzari G. 2001.** Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*. 55:1341-1357.
- Gordon I. 1994.** *Laboratory Production Of Cattle Embryo*. Cambridge: CAB International, University Press, 640p.
- Holm P., Booth P.J., Schmidt M.H., Greve T. & Callesen H. 1999.** High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*. 52: 683-700.
- Jewgenow K., Heerdegen B. & Muller K. 1999.** *In vitro* development of individually matured bovine oocytes in relation to follicular atresia. *Theriogenology*. 51: 745-756.
- Kaiser G., Alberio R., Brum D.S., Bernardi M.L., Silva C.A.M., Rubin M.I.B., Aller J. & Palma G.A. 1999.** Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em criotubos e em estufa portátil. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*. 27 (Supl): 241.
- Kurtz Filho M. 2003.** Maturação e fecundação de oócitos bovinos mantidos em banho-maria. 67f. Santa Maria, RS. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.
- Lehmkuhl R.C. 2001.** Desenvolvimento de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular. Santa Maria. 16f. Santa Maria, RS. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.
- Leivas F.G. 2002.** Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação sem controle de atmosfera gasosa. 40f. Santa Maria, RS. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.
- Neglia G., Gasparri B., Di Brienza V.C., Di Palo R., Campanile G., Presicce G.A. & Zicarelli L. 2003.** Bovine and buffalo *in vitro* embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology*. 59:1123-1130.

- 17 Olivier N.S., Palma G.A. & Alberio R. 1998. *In vitro* production of bovine embryos in water bath. *Theriogenology*. 49: 211.
- 18 Oyamada T., Iwayama H. & Fukui Y. 2003. Bovine blastocyst production by an individual oocyte culture during IVM/IVF/IVC using a chemically defined medium. *Theriogenology*. 59: 348.
- 19 Palma G.A., Clement-Sengewald A., Berg U. & Brem G. 1992. Role of the embryo number in the development of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*. 37: 271.
- 20 Palma G.A., Olivier N., Alberio R.H. & Brem G. 1998. *In vitro* development and viability of bovine embryos produced without gassed incubator. *Theriogenology*. 49: 213.
- 21 Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Leibfried-Rutledge M.L., Critser E.S., Eyestone W.H. & First N.L. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*. 25: 591-600.
- 22 Pinto M.G.L., Alves D.F., Rauber L.P., Sá Filho M.F., Mezzalira A., Bernardi M.L., Silva C.A.M. & Rubin M.I.B. 2002. Holding bovine oocytes on equine follicular fluid for IVP. *Theriogenology*. 57: 736.
- 23 Rauber L.P. 2003. Líquido folicular bovino na produção *in vitro* de embriões bovinos. 46f. Santa Maria, RS. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.
- 24 SAS INSTITUTE (Cary NC) 1998. SAS user's guide: Statistical Analysis, *Release 6.12*. 2576p.
- 25 Schwartz J., Schneider M.R., Rodrigues J.L. & Reichenbach H-D. 1998. Effect of short-term storage of bovine oocytes in different media and temperatures on the subsequent *in vitro* embryo development. *Theriogenology*. 49: 217.
- 26 Shi D.S., Avery B. & Greve T. 1998. Effects of temperature on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*. 50: 667-674.
- 27 Suzuki T., Sumantri C., Khan N.H.A., Murakami M. & Saha S. 1997. Development of a simple, portable carbon dioxide incubator for production of bovine IFV embryos. *Theriogenology*. 43: 330.
- 28 Twagiramungu H., Morin N., Guilbault L.A., Sirard M.A. & Bousquet D. 1998. Media and time of oocytes transport influence their developmental competence for *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*. 49: 299.
- 29 Ward F.A., Enright B.P. & Boland M.P. 2000. Effect of group size and oocyte to medium volume post-fertilization on the development of bovine embryos *in vitro*. *Theriogenology*. 53: 306.
- 30 Wolf E., Boxhammer K., Brem G., Prella K., Reichenbach H.D., Reischl J., Santl B., Schernthaner W., Stojkovic M., Wenigerkind H. & Zakhartchenko V. 1998. Recent progress in the *in vitro* production and cloning of bovine embryos. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*. 26 (Supl): 160-177.