

Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science (2003) 40:279-286
ISSN printed: 1413-9596
ISSN on-line: 1678-4456

Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes

In vitro embryo development from bovine oocytes maintained in follicular fluid or TCM-hepes

Denis Faustino ALVES¹;
Lucio Pereira RAUBER¹;
Fernanda Bastos Rubin¹;
Mari Lourdes BERNARDI²;
Diogenes Dezen¹;
Carlos Antônio Mondino SILVA¹;
Mara Iolanda Batistella RUBIN¹

1 Embryolab - Departamento de Clínica de Grandes Animais do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS
2 Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS

Resumo

Complexos Cumulus-Oócito (CCO) bovinos foram divididos em 4 grupos para avaliar o seu comportamento durante a manutenção em LFb e maturação *in vitro* (MIV) em TCM-199 com ou sem Hepes. CCO MIV por 24h em TCM-199 em estufa a 39°C com 5,00% de CO₂ (Controle) tiveram o seu desenvolvimento comparado ao de CCO MIV em tubos repletos de TCM-HEPES (5,95 mg/mL), em banho-maria (BM) a 39°C por 24h (Grupo 1 - BM24h), ao de CCO mantidos em líquido folicular bovino (LFb), por 6h a 30°C seguido de maturação por 18h nas mesmas condições que o grupo Controle (Grupo 2 - LFb6C18h) e ao de CCO mantidos em LFb seguido da maturação por 18h sob as mesmas condições que o grupo 1 (Grupo 3 - LFb6BM18h). A fecundação foi realizada em FERT-TALP por 18h. Os zigotos foram cultivados em SOFaaci, sob óleo mineral, em bolsas plásticas gaseificadas. A taxa de clivagem no Grupo Controle foi superior a do Grupo 3 (P<0,05), mas não houve diferença no percentual de blastocistos no D7 e D9 e no de blastocistos eclodidos entre os 4 grupos. Portanto, oócitos podem ser mantidos por 6h em LFb, a 30°C, antes da maturação em TCM-HEPES por 18h ou ser maturados por 24h, em TCM-HEPES, em banho-maria a 39°C, sem atmosfera gasosa controlada. A simplificação da MIV aqui introduzida através do preenchimento de tubos de 1,0mL com TCM-HEPES e manutenção em banho-maria a 39°C, poderá ser uma opção viável e prática para os programas de OPU/PIV em bovinos.

Palavras-chave

Oócitos bovinos.
Embrião.
Maturação.

Correspondência para:

DENIS FAUSTINO ALVES
Embryolab, Departamento de Clínica de Grandes Animais
Hospital Veterinário - Centro de Ciências Rurais - UFSM
97.105-900 - Santa Maria - RS
e-mail: dfaives@lince.hcv.ufsm.br ou embriao@www.ufsm.br

Recebido para publicação: 03/12/2002
Aprovado para publicação: 06/05/2003

Introdução

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos obteve avanços consideráveis nos últimos anos e está sendo rapidamente incorporada aos projetos de produção. Por outro lado a aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-sonografia - OPU¹, já pode ser realizada no campo e pode ser

empregada na produção de embriões bovinos, favorecendo os programas de melhoramento genético.

O intervalo entre a recuperação e a maturação em laboratório, bem como as condições de armazenamento dos oócitos durante o transporte, afetam a sua capacidade de desenvolvimento². De acordo com alguns autores^{3,4}, a diminuição da variação do pH dos

meios é de grande importância para melhorar resultados na PIV.

No sistema de tamponamento de meios através de bicarbonato/ CO_2 o controle do pH pode ser efetuado pela mudança da concentração de bicarbonato no meio, ou pelo conteúdo de CO_2 na atmosfera gasosa. Nos sistemas onde não se utiliza uma atmosfera controlada, produzida por estufas de cultivo, o tamponamento dos meios pode ser realizado pelo uso de um tampão orgânico denominado HEPES [N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácidoetanosulfônico)].

Alguns autores testaram a capacidade de desenvolvimento de oócitos com a manutenção e o transporte realizado em TCM-199 acrescido de Bicarbonato^{5,6} ou HEPES^{5,6,7,8}. Além dos meios sintéticos, líquidos biológicos também foram utilizados na manutenção de oócitos, (p.ex.: o líquido folicular bovino - LFb). O LFb obtido de folículos entre 2 e 8 mm de diâmetro vem sendo utilizado para o transporte de oócitos⁹, para a sua manutenção^{10,11} e também como inibidor do reinício da meiose^{12,13}.

Um dos principais motivos da PIV reduzida de embriões é a falta de competência dos oócitos antes da maturação. Quando os oócitos são retirados do líquido folicular retomam a meiose espontaneamente. A retenção do oócito na fase de vesícula germinativa (VG) após a retirada do folículo, é uma alternativa para favorecer a competência para que se desenvolva após a fecundação^{14,15}. Por isso, procurou-se avaliar se a exposição de oócitos à LFb e a sua maturação com TCM-199+HEPES sem atmosfera gasosa poderia modificar o seu comportamento na PIV.

Material e Método

Os ovários utilizados foram obtidos de frigorífico e transportados a 30°C em solução fisiológica de NaCl a 0,90% acrescida de 100mg/mL de

estreptomicina e 50UI/mL de penicilina G-Potássica, em tempo não superior a duas horas após o abate. Os oócitos foram mantidos em líquido folicular para a busca e seleção sob lupa estereomicroscópica. Nesta seleção observou-se o aspecto morfológico dos Complexos Cumulus-Oócito (CCO), conforme o critério de avaliação descrito por De Loos et al.¹⁶. Os CCO de qualidade I e II foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de 25 oócitos.

No Grupo Controle, os CCO foram lavados em quatro gotas de meio TCM-HEPES, composto de TCM-199^d modificado, adicionado de 5,95mg/mL de HEPES (H6147), 0,025mg/mL de piruvato de sódio, 2,2 mg/mL de NaHCO_3 e 10,00% de soro de égua em estro (SEE) processado conforme Figueiró et al.¹⁷. Esse grupo foi passado ao meio de maturação *in vitro* (MIV), constituído pelo meio TCM-199 acrescido de 0,01UI de rFSH-h/mL, em gotas de 400mL, em placas de cultivo de quatro poços, onde permaneceram por 24h em estufa de cultivo, na temperatura de 39°C, com 5,00% de CO_2 em ar e umidade saturada.

Os CCO do Grupo 1 foram passados em quatro gotas do meio TCM-HEPES e mantidos em tubos de 1,0 mL repletos de meio de maturação, com todos os componentes utilizados para o Controle; realizou-se, no entanto, a troca do HEPES sem sódio (H6147) para HEPES com sódio (H7006 – 5,95 mg/mL), excluindo também o bicarbonato de sódio. Logo após, os tubos foram selados e envoltos em papel alumínio e mantidos em banho-maria a 39°C por 24h, sem atmosfera gasosa controlada.

O LFb para manutenção dos CCO dos Grupos 2 e 3 foi obtido a cada rotina, através da punção de folículos com diâmetro entre 2 a 8mm.

O LFb foi centrifugado por 10 minutos a 1000g para separação das células foliculares e recuperação do sobrenadante.

Os CCO do Grupo 2 foram colocados em tubos de poliestireno de 5mL, com fundo cônico, contendo 400mL de LFb. Os tubos foram selados e envoltos em papel alumínio e mantidos por um período de 6h, a 30°C. Posteriormente, a maturação foi efetuada por 18h em TCM-199, em estufa com 5,00% CO₂ em ar e umidade saturada.

Os CCO do Grupo 3 foram mantidos em LFb por 6h seguidos de maturação em banho-maria a 39°C por 18h com meio TCM-HEPES, com os mesmos componentes do Grupo 1, sem atmosfera gasosa controlada.

Após a maturação os CCO foram transferidos para gotas de 400mL de meio TALP-FERT¹⁸ em placas de quatro poços, acrescido de 6mg/mL de BSA, 0,11mg/mL de piruvato de sódio, 30mg/mL de heparina e PHE, estabilizado em estufa por duas horas. Para a fecundação utilizou-se sêmen congelado de um touro *Bos taurus*. A separação dos espermatozoides viáveis foi feita em meio TALP-SPERM acrescido de 6mg/mL BSA e 0,22mg/mL de piruvato de sódio, utilizando a técnica de migração ascendente. A inseminação foi efetuada em uma concentração de 1x10⁶ espermatozoides/mL. A incubação dos CCO e espermatozoides foi conduzida em estufa de cultivo a 39°C, com 5,00% de CO₂ em ar, com umidade saturada, por um período de 18 h.

Após o período de fecundação, os prováveis zigotos foram desnudados através de agitador mecânico. Para este procedimento utilizou-se o meio TCM-HEPES com 10,00% de SEE

e 0,025 mg/mL de piruvato de sódio. Em seguida, os prováveis zigotos foram transferidos para 400mL de meio SOFaaci - *Synthetic Oviduct Fluid*¹⁹, contendo 10,00% de SEE, onde permaneceram por 8 dias em gotas de 400mL em placas de quatro poços, sob óleo mineral. A partir do segundo dia após fecundação, o cultivo foi efetuado em bolsas plásticas com uma mistura gasosa de 5,00% de CO₂, 5,00% de O₂ e 90,00% de N₂²⁰ colocadas em estufa de cultivo na temperatura de 39°C. Após a avaliação da taxa de desenvolvimento em D9, os blastocistos eclodidos de todos os grupos foram fixados em paraformolaldeído a 2,00%, para realizar a contagem do número de células. Os embriões foram corados com Hoechst na concentração final de 10 mg/mL de PBS salino. A visualização e a contagem dos núcleos foram efetuadas em microscópio de epifluorescência equipado com filtro de excitação (365nm) e filtro de barreira (410 nm).

Foi realizada em 3 rotinas uma avaliação do pH (Figura 1) e a osmolaridade (Figura 2) do meio TCM-Hepes no início (0h) e no final da maturação (24h) e também do líquido folicular bovino no início (0h) e no final da manutenção (6h).

Delineamento experimental e análise estatística

A maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de todos os tratamentos foram conduzidos simultaneamente, sendo efetuadas 14 repetições. As taxas de clivagem e de blastocistos foram avaliadas em D2 e D7, respectivamente. A taxa de blastocistos expandidos e eclodidos foi avaliada em D9 e, a taxa de eclosão em D9, foi obtida sobre o total de embriões em D7, considerando-se a data da fecundação como D0.

Os dados foram analisados pelo procedimento GLM, do pacote estatístico SAS²¹. Para as taxas de clivagem, de blastocistos em D7 e D9 e de eclosão em D9, cada repetição

foi considerada um bloco, sendo mantido no modelo estatístico, quando significativo. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5,00%.

Figura 1

Valores do pH do TCM-HEPES e líquido folicular, inicial e final.

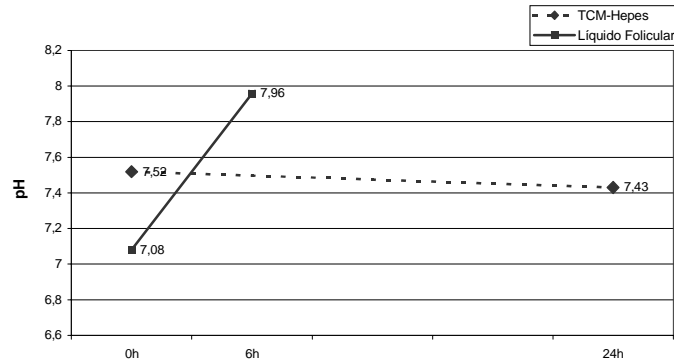
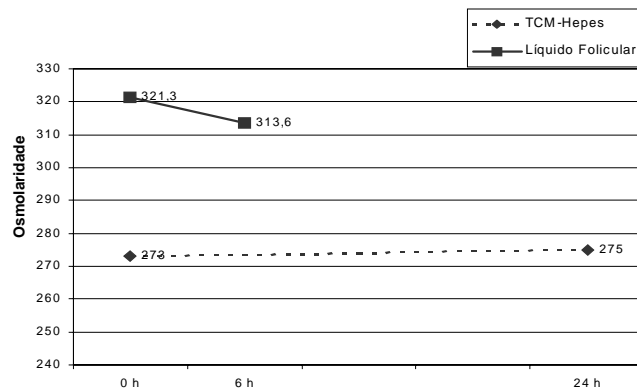


Figura 2

Valores da osmolaridade do TCM-HEPES e líquido folicular, inicial e final.



Resultados e Discussão

Para melhorar a eficiência do transporte de oócitos obtidos por aspiração folicular usou-se, inicialmente, TCM-199 acrescido de bicarbonato^{5,6}. A necessidade de gaseificação prévia desses meios em estufas de cultivo com atmosfera controlada se apresentava como uma desvantagem. O principal motivo da diminuição da produção embrionária quando se realizava o transporte nessas condições por um período maior que 6h⁵ poderia ser a

variação no pH dos meios reduzindo assim os índices de embriões na PIV.

Na busca de melhorar esses resultados, foi utilizado neste trabalho o TCM-199 acrescido de Hepes e FSH sem atmosfera controlada. O percentual de estruturas clivadas, de blastocistos em D7, de blastocistos em D9 e de eclodidos em D9, aqui observado para os diferentes grupos, estão descritos na Tabela 1. Apesar de não haver diferença significativa entre a taxa de clivagem e de embriões em D7 e D9, assim como de eclodidos

em D9, entre o Grupo Controle e o Grupo 1, onde os oócitos foram maturados em TCM-HEPES na ausência de atmosfera gasosa, pode-se observar uma constância na qualidade da produção embrionária do Grupo 1 quando os oócitos foram maturados nessas condições.

O fato de LEIVAS et al.⁸ terem realizado o transporte de oócitos em tubos de poliestireno com 400mL de TCM-HEPES, sob óleo mineral, em banho-maria a 39°C, por 6, 12 e 18h, completando 24h de maturação em estufa, não ter apresentado bons resultados após 12 horas de maturação, pode-se dever ao fato de que, aqui neste experimento, ao se acondicionar os oócitos em tubos repletos de meio, evitando o seu contato com ar, deve-se ter diminuído a variação do pH do meio, melhorando as condições de maturação. Prova disso é que os autores verificaram um efeito prejudicial no desenvolvimento embrionário, quando os oócitos foram transportados-maturados em TCM-HEPES por 18h, com o pequeno volume de 400mL sob óleo mineral. No entanto, a partir da clivagem, não foram constatadas diferenças ($P>0,05$) na taxa de blastocistos em D7 e D9 e na taxa de eclosão em D9, entre os tratamentos.

Houve diferença ($P<0,05$) na taxa de clivagem entre o grupo de oócitos do grupo Controle e o grupo mantido em LFb por 6h e maturado em banho-maria por 18h sem atmosfera gasosa (Grupo 3); fica por esclarecer se a interferência do LFb na manutenção e na pré-maturação possa ser responsabilizada por isso.

A maturação final oocitária ocorre no folículo ovulatório e depende do pico de LH, esta é caracterizada por mudanças citoplasmáticas^{22,23,24,25} e partir disto o oócito é considerado maduro e já teria se desenvolvido e modulado o mecanismo biológico celular para sustentar a fertilização e iniciar o desenvolvimento embrionário^{22,23,24,26}. Oócitos utilizados na PIV são coletados de folículos antrais pequenos

e médios sendo imediatamente maturados *in vitro* por um período de 24h. O período de dominância folicular semelhante a situação *in vivo* se desenvolve durante o procedimento padrão de maturação *in vitro*²². Seria importante mimetizar o efeito da dominância folicular na capacitação oocitária^{14,22,27}; isso poderia ser feito utilizando o LFb para o bloqueio do reinício da meiose, fica por esclarecer se isso realmente ocorre. Se isso acontece, a adição do LFb levaria a capacitação citoplasmática antes do reinício da maturação nuclear, reforçando esta hipótese podemos observar que o grupo 3 mesmo com um menor número de estruturas clivadas conseguiu os mesmos índices de embriões em D7 e D9 comparado ao grupo Controle.

Lehmkuhl et al.¹⁰ mantiveram oócitos em LFb por 5 horas observando no fim deste período que 66,00% deles estavam em estágio de vesícula germinativa (VG), 25,00% quebraram a vesícula germinativa (QVG) (VGB) e 8,30% em metáfase I (MI). Pode-se dizer que a manutenção dos oócitos em banho-maria a 39°C em TCM-HEPES e LFb não prejudicou o desenvolvimento embrionário. Os dados descritos por Olivier et al.²⁸ corroboram esses resultados.

Não houve diferença no número médio de células dos embriões eclodidos ($P>0,05$) entre os grupos (Tabela 2). Esse número é indicador da qualidade dos embriões produzidos em todos os grupos e do protocolo de maturação, fecundação e cultivo. Deve-se enfatizar que a simplificação do processo de maturação sem atmosfera gasosa controlada é um fator importante a ser incorporado aos protocolos de OPU-PIV de embriões bovinos.

Com relação ao pH do líquido folicular, utilizado para manutenção dos oócitos, podemos observar na Figura 1 que após 6h este aumentou de 7,08 para 7,96. Esse aumento no pH pode ser devido ao baixo volume de LFb (400mL) no tubo de 5mL. Uma forma

Tabela 1

Desenvolvimento embrionário após a fecundação *in vitro* de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular bovino ou TCM-HEPES, Santa Maria – RS, 2002

Grupos de Maturação	Oócitos	Clivagem n	Embriões D7	Embriões D9	Ecloração (D9)
	N	n(%)	n (%)	n (%)	n (%)
Controle	362	331 (91.4) ^a	131 (36.2) ^a	82 (22.7) ^a	54/131 (41.2) ^a
Grupo 1	344	304 (88.4) ^{ab}	132 (38.4) ^a	83 (24.1) ^a	57/132 (43.2) ^a
Grupo 2	343	308 (89.8) ^{ab}	115 (33.6) ^a	71 (20.7) ^a	41/115 (35.7) ^a
Grupo 3	332	278 (83.7) ^b	111 (33.4) ^a	76 (22.9) ^a	45/111 (40.5) ^a

^{a,b} Means within columns without common superscripts differ (P<0.05)

Controle – Maturação em TCM-199 em estufa; Grupo 1 – Maturação em TCM-Hepes em banho-maria; Grupo 2 – Manutenção em líquido folicular bovino por 6 horas e maturação por 18h em TCM-199 em estufa; Grupo 3 – Manutenção em líquido folicular bovino por 6 horas e maturação por 18h em TCM-Hepes em banho-maria.

Tabela 2

Número médio de células, visualizadas por coloração fluorescente com Hoechst, de blastocistos eclodidos obtidos após a fecundação de oócitos mantidos em líquido folicular bovino ou TCM-HEPES, Santa Maria – RS, 2002

Maturação	Número de células ± desvio-padrão (variação)
Controle (n=26)	141.4 ± 28.0 (82-259)
Grupo 1 (n=34)	138.9 ± 26.7 (78-237)
Grupo 2 (n=29)	132.9 ± 30.1 (61-215)
Grupo 3 (n=26)	143.3 ± 34.9 (68-247)

(P>0.05)

Controle – Maturação em TCM-199 em estufa; Grupo 1 – Maturação em TCM-Hepes em banho-maria; Grupo 2 – Manutenção em líquido folicular bovino por 6 horas e maturação por 18h em TCM-199 em estufa; Grupo 3 – Manutenção em líquido folicular bovino por 6 horas e maturação por 18h em TCM-Hepes em banho-maria.

de minimizar esse efeito seria preencher todo o tubo com LFB, deixando somente LFB no interior do mesmo. Atualmente na literatura não há dados sobre a mensuração de pH de LFB quando utilizado nestas condições, indicando assim uma necessidade de novos experimentos para observar

melhor essa variação e seus possíveis efeitos no desenvolvimento embrionário. Já que neste trabalho não observa-se diferenças significativas no grupo Controle com os grupos mantidos em LFB por 6h.

Conclusão

O transporte de oócitos bovinos em LFB por 6h a 30°C não prejudica o desenvolvimento embrionário. Já o transporte-maturação em TCM-HEPES por 24h em banho-maria a 39°C na ausência de atmosfera gasosa, pela constância da qualidade da produção embrionária, pode ser uma contribuição importante aos protocolos de OPU/PIV, por eliminar a necessidade do emprego de meios previamente gaseificados no transporte de oócitos recém-aspirados por um período maior, viabilizando ainda mais o emprego da OPU/PIV.

Summary

In order to evaluate the effect of a transport medium on the rate of *in vitro* embryonic development, 1381 Cumulus-oocyte Complexes (COC) were obtained by aspiration of 2-8mm diameter follicles which were randomly divided in 4 treatment groups. The Control group was formed by oocytes matured in modified TCM-199 for 24h, incubated at 39°C and 5,00% CO₂ with saturated humidity. The group 1 (WB24h), included oocytes matured in 1.0mL tubes containing TCM-HEPES (5.95mg/

Key-words

Bovine.
Oocytes.
Embryo.
Maturation.

mL), in water bath (WB) at 39°C for 24h. The group 2 (FFb6C18h), included oocytes kept in bovine follicular fluid (FFb) for 6h at 30°C followed by a period of 18h maturation under the same conditions as the Control group and with the oocytes maintained in FFb followed by 18h IVM under the same conditions as the group 1, group 3 (FFb6WB18h). Fertilization was performed in FERT-TALP for 18h. Zygotes were cultured in SOFaaci under mineral oil within gasified bags. The cleavage rate differed ($P < 0.05$) between the Control and FFb6BM18h groups. However, there was no difference on the D7 and D9 blastocyst rates and on the percentage of blastocyst eclosed. It was concluded that it is possible to maintain the oocytes in FFb for 6h at 30°C before 18h IVM, or to proote the transport and maturation of the oocytes for 24h, in TCM-HEPES and water-bath at 39°C, without compromising embryonic development. The simplification of MIV showed in this experiment through of tubes (1.0mL) replete with TCM-HEPES and holding in water bath at 39°C, could be a viable and practice for the bovine programs of OPU/PIV.

Referências

- 1- PIETERSE, M. C.; KAPPEN, K. A. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, New York, v. 30, n. , p. 751-762, 1988.
- 2- SCHWARTZ, J. et al. Effect of short-term storage of bovine oocytes in different media and temperatures on the subsequent *in vitro* embryo development. **Theriogenology**, New York, v. 49, n. , p. 217, 1998.
- 3- FUKUI, Y. et al. Factors affecting the *in vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. **J. Reprod. Fertil**, v. 92, n. , p. 125-131, 1991.
- 4- VAJTA, G. et al. Effect of pH of culture medium on *in vitro* development of bovine embryos. **Theriogenology**, New York, v. 47, n. , p. 286, 1997.
- 5- TWAGIRAMUNGU, H. et al. Media and time of oocytes transport influence their developmental competence for *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, New York, v. 49, n. , p. 299, 1998.
- 6- FRY, R. C. et al. No difference in embryo production from oocytes collected by ovum pick-up from commercial cows when using either hepes or bicarbonate-buffered IVM media. **Theriogenology**, New York, v. 53, n. , p. 304, 2000.
- 7- KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B. G. Enhanced production of bovine blastocysts in defined media with appropriate polyvinyl alcohol (pva) and hepes concentrations. **Theriogenology**, New York, v. 45, p. 360, 1996.
- 8- LEIVAS, F. G. et al. Transport of bovine oocytes in TCM-HEPES maturation medium without controlled atmosphere. **Theriogenology**, New York, v. 57, p. 726, 2002.
- 9- SCHNEIDER, M. R.; RODRIGUES, J. L. Avaliação de sistemas de armazenamento de oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 25, n. 2, p. 133-136, 1997. Suplemento1.
- 10- LEHMKUHL, R. C. et al. Desenvolvimento de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular e submetidos a FIV. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 28, p. 276, 2000. Suplemento1.
- 11- PINTO, M. G. L. et al. Holding bovine oocytes on equine follicular fluid for IVP. **Theriogenology**, New York, v. 57, p. 736, 2002.
- 12- TSAFRIRI, A.; CHANNING, C. P. An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis *in vitro*. **Endocrinology**, v. 96, n. , p. 922-927, 1975.
- 13- DODE, M. A. N. et al. Retenção da meiose de ovócitos bovinos em líquido folicular de foliculos de vários tamanhos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 28, p. 241, 2000. Suplemento1.
- 14- LONERGAN, P. et al. Bovine blastocyst production *in vitro* following inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 hours. **Theriogenology**, New York, v. 47, p. 293, 1997.
- 15- ADONA, P. R. et al. Retenção da meiose em foliculos inteiros. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 28, n. , p. 192, 2000.
- 16- DELOSS, F. et al. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, New York, v. 24, n. , p. 197-204, 1989.
- 17- FIGUEIRO, G.M. et al. Soro equino na PIV de embriões bovinos: I. Uma análise do soro de égua em diferentes estágios do cio. **Arq. Fac.**

- Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 28, p. 258, 2000. Suplemento1.
- 18- PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. et al. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, New York, v. 25, p. 591-600, 1986.
- 19- HOLM, P. et al. 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**, New York, v. 52, p. 683-700, 1999.
- 20- PALMA, G.A. et al. *In vitro* development and viability of bovine embryos produced without gassed incubator. **Theriogenology**, New York, v. 49, n. , p. 213, 1998.
- 21- SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistical analysis system, Release 6.12-1998. Cary, 1998.
- 22- HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, New York, v. 47, p. 23-32, 1997.
- 23- KRISHER, R. L.; BAVISTER, B. D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, New York, v. 49, p. 103-114, 1998.
- 24- BEVERS, M. M. et al. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, New York, v. 47, p. 13-22, 2000.
- 25- MERMILLOD, P.; OUSSAID, B.; COGNIÉ, Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. **J. Reprod. Fertil.**, v. 54, p. 449, 1999.
- 26- SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, New York, v. 55, n. , p. 1241-1254, 2001.
- 27- HENDRIKSEN, P. J. M. et al. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 53, n. , p. 11-20, 2000.
- 28- OLIVIER, N. et al. The use of polystyrol tubes and water-bath for *in vitro* production of bovine embryos. In: REUNION A.E.T.E., 14., 1998, Venise. **Proceedings...** p.220.