

INTRODUÇÃO

Os primeiros estudos sobre fecundação *in vitro* em bovinos iniciaram na década de 60, com a produção do primeiro blastocisto em 1968 [37,38]. Em 1987 foi divulgada a primeira prenhez produzida por um processo totalmente *in vitro* [25], gerando no ano seguinte o nascimento de gêmeos [26].

Desde então, os estudos sobre a produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos foram desenvolvidos em busca de um protocolo definido, isto é, um meio com composição definida sem fonte protéica de origem animal, que reduziria a grande variabilidade entre as taxas de produção de embriões nos laboratórios. Os protocolos desenvolvidos com meios definidos ainda não apresentam taxas de PIV de embriões que se equiparem às taxas obtidas com protocolos cujos meios utilizados contêm soro [16,19,27,32,43].

O soro heterólogo, principalmente o soro fetal bovino, é utilizado na produção *in vitro* (PIV) de embriões nas diferentes espécies animais [9,17,24,33,46]. A adição do soro equino na PIV de embriões bovinos baseia-se nos excelentes resultados obtidos por Mezzalira [28-30] com embriões de camundongos em estágios iniciais, cultivados em meios com soro equino, no final da década de 80.

O uso de soro de égua poderia ser uma alternativa para evitar a transmissão de doenças espécie-específicas que podem ser carregadas pelos diferentes materiais de origem protéica, fontes potenciais de patógenos. Além disto, apresenta como vantagem a facilidade de obtenção de grande quantidade de soro numa única coleta, quando comparado com a obtenção de soro bovino.

Este experimento teve como objetivo avaliar o uso do soro de égua obtido em diferentes fase do estro na produção *in vitro* de embriões bovinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do soro

O soro foi obtido de 9 éguas com sanidade comprovada, sendo coletado durante três etapas distintas do estro. O sangue foi coletado em tubos de

ensaio com vácuo, através da punção da veia jugular, sendo o mesmo mantido até a retração do coágulo, à temperatura ambiente. Em seguida, o soro foi centrifugado nos mesmos tubos e, após a retirada do soro, este foi novamente centrifugado em tubos cônicos¹ de 15ml. O soro foi inativado em banho-maria por 30 minutos à temperatura de 56°C, separado em 3 grupos, filtrado, identificado e armazenado a -20°C.

Tratamento 1 (T1) = soro obtido de três éguas no primeiro dia do estro;

Tratamento 2 (T2) = soro obtido de três éguas 24-48h antes da ovulação;

Tratamento 3 (T3) = soro obtido de três éguas 24-48h após a ovulação;

Controle (C) = soro de vaca em estro (SVE).

Todos estes estágios do estro foram determinados pela anamnese e palpação retal seguida de ultra-sonografia. O SVE utilizado no experimento foi o mesmo empregado nas rotinas do laboratório.

Coleta dos ovários e seleção dos oócitos bovinos

Os ovários foram coletados em frigoríficos localizados numa distância máxima de 30 km do laboratório onde foi efetuada a PIV e transportados em solução de 0,9% de NaCl acrescida de 50UI/ml de Penicilina G-Potássica², à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$). Os folículos com diâmetro entre 2-8mm foram puncionados com auxílio de uma bomba de vácuo. Os oócitos recuperados foram mantidos em líquido folicular até o momento da seleção, quando foram classificados de acordo com o critério de avaliação descrito por DeLoos [5], utilizando-se apenas oócitos de categoria 1 e 2.

Maturação *in vitro* dos oócitos

Após a escolha e seleção dos oócitos, estes foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de 20 a 40 oócitos, lavados seis vezes com o meio de maturação, composto de TCM-199³ modificado adicionado de 5,95mg/ml de Hepes⁴, 0,025mg/ml de piruvato de sódio⁴, 0,5mg/ml de hormônio luteinizante

bovino⁵ (LHb), 0,01UI de hormônio foliculo estimulante recombinante humano⁶ (rFSHh), 2,2mg/ml de bicarbonato de sódio⁴ e 10% soro de égua, do primeiro dia do estro (T1), de 24-48h antes da ovulação (T2), de 24-48h após a ovulação (T3) ou SVE (C).

Após a lavagem, os oócitos foram colocados em placas de cultivo de quatro poços⁷ com 400µl de meio de maturação e levados à estufa⁸ com 5% de CO₂ à temperatura de 39°C e umidade saturada, por 22 a 24 horas.

Fecundação *in vitro* dos oócitos

Após a maturação, os oócitos foram transferidos para placas de quatro poços com 400µl de meio TALP-FERT, adicionado de 20mg/ml de heparina⁴, 6mg/ml de BSA⁴ e 0,22mg/ml de piruvato de sódio, previamente estabilizados na placa em estufa por duas horas.

Para a fecundação foi utilizado sêmen congelado de um “pool” de touros *Bos taurus*. O descongelamento foi realizado a 39°C por 20 segundos, sendo depositadas alíquotas de 100µl sob 1,0ml de meio TALP-SPERM acrescido de 6mg/ml de BSA e 0,011mg/ml de piruvato de sódio, em tubos cônicos de 15ml. Estes foram mantidos a 39°C por uma hora em banho-maria para a migração ascendente (“swim up”) dos espermatozoides. Após, o sobrenadante (800µl) de cada tubo foi retirado e colocado em outro tubo e submetido à centrifugação por 10 minutos a 500g. O sedimento de cada tubo foi pipetado (±210µl), homogenizado e a dose inseminante foi de 1x10⁶ espermatozoides/ml. O tempo de incubação conjunta dos oócitos e espermatozoides foi de 18 a 22 horas, sob atmosfera controlada, nas mesmas condições da maturação.

Cultivo *in vitro* dos embriões

Após a fecundação, os oócitos/zigotos foram transferidos para 400µl de meio SOF acrescido de 20µl/ml de aminoácidos essenciais, 10µl/ml de aminoácidos não-essenciais [19] + 5% soro (T1, T2, T3 ou C), conforme o tratamento, e submetidos a um processo de agitação mecânica para o desnudamento das células do *cumulus oophorus*. Logo após, os

oócitos/zigotos foram lavados no meio de cultivo e transferidos para gotas de 400µl com meio SOF acrescido de 5% do respectivo soro, sob óleo para imediatamente serem submetidos ao cultivo em estufa à 39°C, com 5% de CO₂ e umidade saturada, por 8 dias.

No 2º dia (D2) após o co-cultivo com os espermatozoides foi realizada a avaliação da clivagem, onde observou-se o número de zigotos com duas ou mais células. No 7º dia (D7) após a fecundação foi efetuada a avaliação do índice de embriões que alcançaram o estágio de blastocisto (desde inicial até os mais avançados) e, 48 horas após, (D9) foi novamente avaliado o número de embriões no estágio de blastocisto, além da taxa de eclosão.

Contagem do número de células

Após a avaliação efetuada no D9, os embriões foram fixados em solução de paraformaldeído a 2%, em PBS salino, para a realização da contagem do número de células. Os núcleos foram corados com o corante Hoechst⁴, sendo visualizados em microscópio de epifluorescência com filtro de excitação (365nm) e filtro de barreira (410nm).

Avaliação *in vivo*

Para a avaliação *in vivo*, 14 embriões foram submetidos ao transporte-cultivo individual por 8 horas, conforme o método preconizado por Brum [4].

Análise estatística

Foram realizadas 14 repetições compostas por quatro tratamentos com 20 a 40 oócitos cada. Para analisar o efeito dos tratamentos sobre a produção de embriões foi utilizado o teste do qui-quadrado, com um nível de significância de 5% e, para analisar o efeito do número de células, foi utilizado o teste de Tukey, sendo submetidos à transformação da raiz quadrada para normalizar os dados. Os dados foram analisados utilizando-se o pacote estatístico SAS [36].

RESULTADOS

Para a produção *in vitro* de embriões bovinos foram cultivados 1945 oócitos, os quais foram distribuídos aleatoriamente entre os tratamentos. A clivagem média foi de 78%, o percentual de embriões em D7 foi de 19% e em D9 foi de 22%. A taxa de eclosão em D9 foi de 5% (Tabela 1).

O número médio de células dos blastocistos expandidos e eclodidos, dos diferentes tratamentos, estão apresentados na Tabela 2 e as taxas de prenhez na Tabela 3.

DISCUSSÃO

O soro é um componente de origem biológica utilizado em muitos protocolos de produção *in vitro*. Ele fornece nutrientes e fatores ainda pouco conhecidos, ou desconhecidos, os quais têm uma grande importância em todo o processo. Há, no entanto, sempre o risco da introdução de agentes patogênicos [2,3,6,15,20,24,34,35,41]. Kniazeff et al. [20] detectaram a presença de vírus como o da diarreia viral bovina (BVD), parainfluenza tipo 3, herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1), enterovírus bovino tipo 4, e

Tabela 1. Produção *in vitro* de embriões bovinos com soro de égua ou de vaca em estro

Tratamento	Oócitos n	Clivagem n (%)	D7 n (%)	D9 n (%)	Eclosão n (%)
T1	477	365 (76,5) ^a	100 (21,0) ^a	125 (26,2) ^a	47 (9,85) ^a
T2	477	374 (78,4) ^a	102 (21,4) ^a	116 (24,3) ^a	15 (3,14) ^b
T3	505	406 (80,4) ^a	100 (19,8) ^a	106 (21,0) ^{a,b}	21 (4,16) ^b
C	486	364 (74,9) ^a	60 (12,3) ^b	80 (16,5) ^b	20 (4,12) ^b
Total	1945	1509 (77,6)	362 (18,6)	427(21,9)	103 (5,30)

^{a,b} Letras diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente (p<0,05)

T1 = soro de égua obtido no primeiro dia do estro

T2 = soro de égua obtido 24-48hs antes da ovulação

T3 = soro de égua obtido 24-48hs após a ovulação

C = soro de vaca em estro

Tabela 2. Número médio de células, visualizadas em epifluorescência e coloração com Hoechst, de embriões bovinos produzidos *in vitro*, com soro de égua ou de vaca em estro

Tratamento	Número de Células			
	Blastocistos Expandidos		Blastocistos Eclodidos	
	n	Média + dp	n	Média + dp
T1 (n=32)	7	67,3 ^a ±19,4	25	129,2 ^a ±36,2
T2 (n=12)	7	88,4 ^a ±16,7	5	91,0 ^{ab} ±37,2
T3 (n=12)	5	64,0 ^a ±17,9	7	71,4 ^b ±21,0
C (n=19)	10	81,2 ^a ±33,5	9	136,3 ^a ±62,9

^{a,b} Letras diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente (p<0,05)

T1 = soro de égua obtido no primeiro dia do estro

T2 = soro de égua obtido 24-48hs antes da ovulação

T3 = soro de égua obtido 24-48hs após a ovulação

C = soro de vaca em estro

Tabela 3. Taxas de prenhez aos 60 dias após a transferência de embriões bovinos produzidos *in vitro*, na presença de soro de égua ou de vaca em estro

Tratamentos	Transferidos (n)	Taxas de prenhez n (%)
Soro eqüino do primeiro dia do estro (T1)	5	2 (40)
Soro eqüino de 24-48hs antes da ovulação (T2)	4	1 (25)
Soro eqüino de 24-48hs após a ovulação (T3)	4	2 (50)
Soro de vaca em estro (Controle)	2	0 (0)

outro não identificado, em 33% dos lotes de soro fetal bovino provenientes de 14 distribuidores. Grande parte destes lotes foram pré-testados e considerados livres pelo fabricante, no entanto, apresentavam viroses endógenas bovinas. Casos de infecção pelo vírus da BVD têm sido relatados como originários não dos embriões, mas do soro fetal bovino ou da albumina sérica bovina, que foram adicionados ao meio de cultivo. Apesar da melhoria dos métodos de coleta e processamento do soro que possibilitam a eliminação de contaminantes exógenos, certas viroses podem permanecer. Os métodos de inativação pelo calor ou radiação gama não são inteiramente eficazes na eliminação da contaminação vírica [31].

O porcentual médio de clivagem obtido na presente pesquisa é semelhante aos observados por outros autores [4,7,8,22,42].

A média de embriões obtidos em D7 é semelhante aos resultados de outros autores que utilizaram meio sem a adição de vitaminas [42] e soro de vaca em estro [4,8]. Em experimento anterior, o soro de égua em estro foi testado por nossa equipe e os resultados obtidos foram superiores [7].

O índice médio de blastocistos em D9 foi superior aos índices observados em D7 indicando a evolução de alguns embriões em estágio menos avançado no sétimo dia e dos que já estavam no estágio de blastocisto, o que é esperado quando os mesmos possuem potencial de desenvolvimento.

A taxa média de embriões em D9 alcançada no presente experimento com o uso do soro de égua foi semelhante aos índices relatados por outros autores [7,8,22] mas inferior aos resultados quando foi usado soro de vaca em estro [16].

Os protocolos de lavagem e tratamento com

tripsina recomendados pelo manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões [39] são eficientes para desinfecção de embriões coletados, embora não sirvam para embriões produzidos *in vitro* [12,21,40,41]. Isto ocorre, provavelmente, devido ao diâmetro dos poros da superfície da zona pelúcida (ZP) dos embriões produzidos *in vitro*, que permitem a penetração do BHV-1 e do BVDV na camada externa da ZP [44].

A utilização de um soro heterólogo pode ser uma importante alternativa para PIV de embriões bovinos, uma vez que sua eficiência seja comprovada. O soro eqüino é livre de atividade neutralizante de alguns vírus, como o da BVD e, por isto, é utilizado para pesquisa da transmissibilidade de patógenos nos processos de PIV [10,11,13,41].

Os resultados obtidos no presente estudo superaram as expectativas, pois a PIV de embriões, nos tratamentos nos quais foi utilizado o soro de égua, foi de 57 a 62% superior ao grupo controle, cujo soro utilizado foi o de vaca em estro. Estes resultados podem ser atribuídos aos fatores inespecíficos encontrados no soro. Figueiró et al.[7] utilizaram como fonte protéica o soro de égua em estro e não verificaram diferença estatística entre os grupos que usaram este soro e o grupo controle que utilizava soro de vaca em estro como fonte protéica, tendo 30% de blastocistos em D7. Outro aspecto que deve ser considerado são as variações individuais existentes entre indivíduos da mesma espécie e, por isso, é importante, em laboratórios que trabalhem com PIV, a análise de várias partidas de soro de diferentes animais e em diferentes misturas. Além disto, as técnicas de preparo deste soro devem ser seguidas criteriosamente para que se tenha a padronização do soro.

O número de células dos embriões PIV pode ser considerado um bom indicador da viabilidade dos mesmos [14]. Existe uma grande variabilidade nas médias do número de células dos embriões PIV, sendo reportados, para blastocistos expandidos, números de 67 [18], 94 [4], 105 [23] e 133 células [1]. Para blastocistos eclodidos os valores variam de 93 a 204 [4,23,45]. Os valores observados no presente experimento se equiparam ou até superam os descritos na literatura. A diferença estatística encontrada na média do número de células dos blastocistos eclodidos entre T1 (129) e C (136) sobre T3 (71) é explicada, provavelmente, pelo baixo número de embriões analisados e não por uma diferença na qualidade dos mesmos.

Outro método para a avaliação da viabilidade dos embriões PIV é a taxa de prenhez e o nascimento de produtos saudáveis como o que ocorreu neste experimento (Tabela 3), apesar do número reduzido de embriões transferidos. O pequeno número de animais utilizados como receptoras e também as condições corporais destas tiveram uma influência negativa sobre a taxa de prenhez, sendo que se espera após transferência de embriões PIV uma taxa de prenhez de 20 a 40%.

CONCLUSÕES

A utilização de soro de égua para a PIV de embriões bovinos é possível, pois os embriões resultantes têm semelhante viabilidade, tanto *in vitro* como *in vivo*, quando comparados com embriões produzidos com soro de vaca. Para maior produção de blastocistos, o soro deve ser coletado, preferencialmente, no primeiro dia do estro das éguas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao “National Hormone and Pituitary Program” – Baltimore, MD, USA, pela gentil cedência do LH utilizado nesta pesquisa. Agradecem também ao Dr. Neimar Corrêa Severo da PECPLAN-ABS-Rosário do Sul, RS, pelo

fornecimento do sêmen utilizado, ao Frigorífico Silva que cedeu os ovários bovinos, ao Setor de Suínos da UFRGS pela utilização do microscópio de epifluorescência e de suas instalações e à Cabanha Santo Isidro pela cedência das receptoras.

NOTAS INFORMATIVAS

- ¹ Corning®, Corning glass works, Corning NY, 14831, USA.
- ² Sigma Chemical CO. - P.O. Box 4508, MO, USA.
- ³ Cultilab Ltda. - Rua Maria Monteiro, 177 Cambuí 13025-150 Campinas, SP.
- ⁴ Sigma Chemical CO. - P.O. Box 4508, MO, USA.
- ⁵ Serono Pharma S.p.A - 70123, Bari, Itália
- ⁶ National Hormone and Pituitary Program – Baltimore, MD, USA
- ⁷ Nunclon, Nunc Brand Products, Denmark, Cat. nº 176740.
- ⁸ W.C. Heraeus GmbH. Postfach 1553 D-6459 Hanau 1, Alemanha.

REFERÊNCIAS

- 1 Avery B. & Quetglas D. 1996.** Evolution of day 8 and 9 *in vitro* derived bovine blastocysts, fertilized with two different bulls. *Theriogenology*. 45: 213.
- 2 Bolin S.R., Matthews P.J. & Ridpath J.F. 1991.** Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhea virus and antibodies against bovine viral diarrhea virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 3: 199-203.
- 3 Brock K.V. 1998.** Controle de qualidade para materiais de origem animal usados em produção e transferência de embriões. In: Stringfellow D.A. & Seidel S.M. (Eds). *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. São Paulo: IETS, pp.141-146.
- 4 Brum D.S., Bernardi M.L., Palma G.A., Leivas F.G., Silva C.A.M & Rubin M.I.B. 2001.** Transporte-cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*. 28: 36-50.
- 5 DeLoss F., Vanvliet C., Vanmaurik P. & Kruip Th.A.M. 1989.** Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Research*. 24: 197-204.

- 6 Erickson G.A., Bolin S.R. & Landgraf J.G. 1991. Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns. *Developmental Biology Standard*. 75: 173-175.
- 7 Figueiró G.M., Mezzalira A., Rauber L.P., Leivas F.G., Almeida N.V., Rubin M.I.B. & Silva C.A.M. 2000. O soro equino na PIV de embriões bovinos: II. Uma análise da adição de FSH e LH. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*. 28(supl): 259.
- 8 Forell F., Oliveira A.T.D. & Rodrigues J.L. 2000. Produção *in vitro* de embriões bovinos adicionando glicose em diferentes momentos do cultivo. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*. 28 (supl): 267.
- 9 Ghasemzadeh-Nava H. & Tajik P. 2000. *In vitro* maturation of ovine follicular oocytes in different concentrations of fetal calf serum and estrous sheep serum. *Theriogenology*. 53: 453.
- 10 Givens M.D., Galik P.K., Ridell K.P., Brock K.V. & Stringfellow D.A. 1999. Bovine viral diarrhea virus associated with IVF embryos does not infect susceptible cells. *Theriogenology*. 51: 271
- 11 Givens M.D., Galik P.K., Riddell K.V., Brock K.V. & Stringfellow D.A. 1999. Quantity and infectivity of embryo-associated bovine viral diarrhea virus and antiviral influence of a blastocyst impede *in vitro* infection of uterine tubal cells. *Theriogenology*. 52: 887-900.
- 12 Givens M.D., Galik P.K., Ridell K.P., Brock K.V. & Stringfellow D.A. 2000. Potential for noncytopathic strains of bovine viral diarrhea virus to associate with IVF embryos and remain infective. *Theriogenology*. 53: 319.
- 13 Givens M.D., Galik P.K., Riddell K.P. & Stringfellow D.A. 1998. Bovine viral diarrhea virus was not detected in association with virally exposed IVF bovine embryos. *Theriogenology*. 49: 252.
- 14 Gordon I. 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryo*. CAB International, University Press, Cambridge, 640 p.
- 15 Guerin B., Nibart M., Marquant-Leguienne B. & Humbolt P. 1997. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic animals. *Theriogenology*. 47: 33-42.
- 16 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.
- 17 Iwasaki T., Kimura E. & Totsukawa K. 1999. Studies on a chemically defined medium for *in vitro* culture of *in vitro* matured and fertilized porcine oocytes. *Theriogenology*. 51: 709-720.
- 18 Jiang H.S., Wang W.L., Lu K.H., Gordon I. & Polge C. 1992. Examination of cell numbers of blastocysts derived from IVM, IF and IVC bovine follicular oocytes. *Theriogenology*. 37: 229.
- 19 Kim J.H., Niwa K., Lim J.M. & Okuda K. 1993. Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids development of *in vitro*-matured, *in vitro*-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biology of Reproduction*. 48: 1320-1325.
- 20 Kniazeff A.J., Wopschall L.J., Hopps H.E. & Morris C.S. 1975. Detection of bovine viruses in fetal bovine serum used in cell culture. *In vitro*. 11: 400-403.
- 21 Langston N.L., Stringfellow D.A., Galik P.K. & Garret G.E. 1999. Failure to wash bluetongue virus from bovine IVF embryos. *Theriogenology*. 51: 273.
- 22 Lehmkuhl R.C., Mezzalira A., Vieira A.D., Silva C.A.M. & Rubin M.I.B. 2000. Desenvolvimento de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular e submetidos a FIV. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*. 27 (supl): 276.
- 23 Lonergan P., Fair T. & Gordon I. 1992. Effect of time of transfer to granulosa cell monolayer and cell-stage at 48 hours post-insemination on bovine oocyte development following IVM/IVF/IVC. In: *Proceedings of the 8th Conference of the European Embryo Transfer Association* (Lyon, France). p.178.
- 24 Long C.R., Dobrinsky J.R. & Johnson, L.A. 1999. *In vitro* production of pig embryos: comparisons of culture media and boars. *Theriogenology*. 51: 1375-1390.
- 25 Lu K.H., Gordon I., Chen H.B. & MCGovern H. 1987. *In vitro* culture of early bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of follicular oocytes matured *in vitro*. In: *Proceedings of the 3rd Conference of the European Embryo Transfer Association* (Lyon, France). p.70.
- 26 Lu K.H., Gordon, I., Chen H.B., Gallagher M. & MCGovern H. 1988. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. *Veterinary Record*. 122: 539-540.
- 27 Marquant-Leguienne B. & Humblot P. 1998. Practical measures to improve *in vitro* blastocyst production in the bovine. *Theriogenology*. 49: 3-11.
- 28 Mezzalira A., Barichello E.M.M.R. & Rubin M.I.B. 1990. Avaliação de diferentes fontes protéicas no cultivo

- de mórulas *Mus musculus* em PBS. In: *V Reunião Anual da SBTE* (Curitiba, Brasil). pp.81-82.
- 29 Mezzalira A., Barichello E.M.M.R. & Rubin M.I.B. 1990.** Cultivo de embriões *Mus musculus* com soro equino. In: *V Reunião Anual da SBTE* (Curitiba, Brasil). pp.83-84.
- 30 Mezzalira A., Barichello E.M.M.R. & Rubin M.I.B. 1990.** Cultivo de mórulas *Mus musculus* em meio de WHITTEN, com diferentes fontes protéicas. In: *V Reunião Anual da SBTE* (Curitiba, Brasil). pp.86-87.
- 31 Palaz A.T. & Del Campo M. 1995.** Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Recent advances. In: *Anais do I Seminário Internacional de Transferencia de Embriones - Biotecnologia y Tecnologia Avanzadas* (Montevideo, Uruguay). pp.78-85.
- 32 Pinyopummintr T. & Bavister B.D. 1991.** *In vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biology of Reproduction*. 45: 736-742.
- 33 Ptak G., Dattena M., Loi P., Tischner M & Cappai P. 1999.** Ovum pick-up in sheep: efficiency of *in vitro* embryo production, vitrification and birth of offspring. *Theriogenology*. 52: 1105-1114.
- 34 Roche P.M., Oliveira E.A.S., Oliveira L.G. & Muñoz J.C.P. 1998.** A situação do vírus da diarreia viral bovina no país. In: *Simpósio Internacional sobre herpesvirus bovinos (Tipo 1 e 5) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV)* (Santa Maria, Brasil). pp.39-48.
- 35 Rossi C.R., Bridgman B.S. & Kiesel G.K. 1980.** Viral contamination of bovine fetal lung cultures and bovine fetal serum. *American Journal of Veterinary Research*. 41: 680-168.
- 36 SAS Institute (Cary NC). 1990.** SAS user's guide: Statistical Analysis System, *Release 6.12*. 2576p.
- 37 Serbian J.M., Scanlon P.F. & Gordon I. 1968.** Culture of fertilized cattle eggs. *Journal of Agriculture Science*. 70: 183-185.
- 38 Sreenan J.M. & Scanlon P.F. 1968.** Continued cleavage of fertilized bovine ova in the rabbit. *Nature*. 217: 867.
- 39 Stringfellow D.A. 1998.** Recomendações para o manuseio sanitário de embriões obtidos *in vivo*. In: Stringfellow D.A. & Seidel S.M. (Eds). *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. São Paulo: IETS, pp.83-88.
- 40 Stringfellow D.A., Riddell K.P., Galik P.K., Damiani P., Bishop M.D. & Wright J.C. 2000.** Quality controls for bovine viral diarrhoea virus-free IVF embryos. *Theriogenology*. 53: 827-839.
- 41 Stringfellow D.A., Riddell K.P., Galik P.K., Damiani P. & Wright J.C. 1999.** Quality controls for bovine viral diarrhoea virus-free IVF embryos. *Theriogenology*. 51: 275.
- 42 Takahashi Y. & First N.L. 1992.** *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*. 37: 963-978.
- 43 Thompson J.G. 1999.** Cultura *in vitro* de embriões bovinos: novas técnicas e conseqüências pós-transferência. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*. 27 (supl): 133-146.
- 44 Vanroose G., Nauwynck H., Van Soom A., Ysebaert M., Charlier G., Van Oostveldt P. & de Kruif A. 1999.** Why is the zona pellucida of *in vitro*-produced embryos an efficient barrier for viral infection? A scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. *Theriogenology*. 51: 276.
- 45 Van Soom A., Vanroose G., Bols P.E.J., Boerjan M.L., Ysebaert M.T. & de Kruif A. 1996.** Timing allocation and number of inner cells *in vitro* produced bovine embryos cultured of oocytes. *Theriogenology*. 45: 193.
- 46 Willis P., Fayrer-Hosken R.A. & Caudle A.B. 1990.** Effect of serum on *in vitro* maturation of equine oocytes. *Theriogenology*. 33: 345.