

Produção *in vitro* de embriões bovinos com soro de égua ou de vaca em estro com ou sem a adição de LH/FSH

In vitro production of bovine embryos with oestrus mare's serum or oestrus cow serum with or without LH/FSH

Giuliano Moraes Figueiró¹ Fábio Galas Leivas¹ Lúcio Pereira Rauber¹ Manoel Francisco de Sá Filho²
Cristiane Elise Teichmann³ Alceu Mezzalira⁴ Mara Iolanda Batistella Rubin⁵
Carlos Antonio Mondino Silva⁵

RESUMO

Mil duzentos e setenta e um oócitos foram divididos em 4 tratamentos com a finalidade de se avaliar a influência da adição de LH e FSH na produção *in vitro* de embriões bovinos com soro de vaca em estro (SVE) ou soro de éguas obtido no 1º dia do estro (SE). Independente do tratamento os oócitos foram maturados com TCM199 + 5,95mg/ml de Hepes, 0,025mg/ml de piruvato de sódio e 2,2mg/ml de bicarbonato de sódio, sendo adicionado 10% de soro de égua (ES), 10% de SVE (VS), 10% de soro de égua + 0,5mg/ml de hormônio luteinizante bovino (LHb) + 0,01UI/ml de hormônio folículo estimulante recombinante humano-rFSHh (EH) e 10% SVE + LHb + rFSHh (VH). Os oócitos assim tratados, foram maturados em estufa com 5% de CO₂ a 39°C sob umidade saturada por 22-24h. Depois, foram fecundados em TALP-FERT por 18-20h e cultivados por 8 dias em meio SOF + 5% de SE (ES e EH) ou SVE (VS e VH). As taxas de clivagem de 72% obtidas no grupo VH (229/316) e 61% no grupo VS (193/315) foram significativamente menores ($p < 0,05$) que as dos grupos ES (80% - 254/317) e EH (80% - 257/323). A produção de embriões (blastocistos iniciais, blastocistos, blastocistos expandidos e eclodidos) no D7 após a inseminação para os grupos ES (32%), EH (28%) e VH (27%), foi significativamente superior aos 20% obtidos no VS ($p < 0,05$). No D9, verificou-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos ES (31%) e EH (29%) quando comparados com o grupo VS (22%), mas não houve diferença quando comparamos com o VH (24%). A taxa de eclosão em D9 foi de 11% (ES), 11% (EH), 10% (VS) e 5% (VH). Não houve diferença entre as médias do número de células dos embriões (Blastocistos expandidos e eclodidos) obtidos no D9. Conclui-se, com estes resultados que, para a obtenção de taxas regulares de blastocistos, não seja necessária a adição de

hormônios quando se utilize o soro de égua, e que os hormônios devam ser adicionados quando se utilize soro de vaca.

Palavras-chave: embriões bovinos, LH, FSH, soro de égua em estro, soro de vaca em estro.

ABSTRACT

A thousand two hundred and seventy-one oocytes were allocated in four treatments, in order to evaluate the influence of the addition of FSH and LH on *in vitro* production of bovine embryos, with oestrous cow serum (OCS) or mare's serum obtained at the first day of estrus (OMS). In all treatments oocytes were matured with TCM199 + 5.95mg/ml Hepes and 0.025mg/ml sodium pyruvate and 2.2mg/ml of sodium bicarbonate, supplemented with 10% OMS (ES), 10% of OCS (VS), 10% of OMS + LHb + rFSHh (EH) and 10% of OCS + LHb + rFSHh (VH). All the treatments groups were matured in a controlled incubator at 39°C with 5% CO₂ and saturated humidity for 22-24h. IVF was performed in TALP-FERT for 18-20h, with a pool of *Bos taurus* semen selected by swim up procedure in TALP-SPERM with 1x10⁶ spermatozoa/ml dose, and cultured for 8 days under SOF medium + 5% OMS (ES and EH) or OCS (VS and VH). The 72% of cleavage rate obtained for treatment VH and 61% obtained in the VS group were significantly less ($p < 0.05$) than treatments EH (80%), ES (80%). Blastocyst rates at D7 after insemination for treatments ES (32%), EH (28%) and VH (27%) were significantly superior than the 20% obtained on VS group ($p < 0.05$). Evaluations at D9 demonstrated higher blastocyst rates in treatment ES (31%) and EH (29%) when compared with treatment VS (22%), but no differences were detected when compared to the VH (24%). These results suggest that the utilization of OCS, the supplementation with FSH and LH

¹Médico Veterinário, Mestre, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Professor, Centro Universitário Vila Velha, Vila Velha, ES. Autor para correspondência. E-mail: moraesg@zaz.com.br ou figeiro@uvv.br

²Bolsista CNPq, Embriolab, UFSM, Santa Maria/RS.

³Médico Veterinário, Santa Maria, RS.

⁴Médico Veterinário, Professor, Doutor, Laboratório de Reprodução Animal, UDESC, Lages, SC.

⁵Médico Veterinário, Professor Titular, Doutor Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM, Santa Maria/RS.

renders an increase on blastocyst rates and, that the utilization of MS, even without FSH and LH, shows similar results as those obtained with OCS plus hormones.

Key words: *embryo, LH, FSH, oestrus mare serum, oestrus cow serum.*

INTRODUÇÃO

A busca de protocolos completamente definidos para a produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos tem sido pesquisada para evitar a grande variabilidade nos resultados atribuída principalmente às fontes proteicas de origem animal. Porém estes protocolos ainda não apresentam taxas de PIV de embriões superiores aos protocolos que utilizem fontes animais (PINYOPUMMINTR & BAVISTER, 1991; KIN et al., 1993; MARQUANT-LEGUIENE & HUMBLLOT, 1998; HOLM et al., 1999; THOMPSON, 1999).

O soro é um componente de origem biológica utilizado em muitos protocolos de PIV que fornece nutrientes e fatores ainda poucos conhecidos, ou desconhecidos, que tem uma grande importância em todo o processo. Há, no entanto, sempre o risco da introdução de agentes patogênicos (KNIAZEFF et al., 1975; ROSSI et al., 1980; BOLIN et al., 1991; ERICKSON et al., 1991; GUERIN et al., 1997; ROEHE et al., 1998; BROCK, 1998; STRINGFELLOW et al., 2000; FIGUEIRÓ et al., 2000). Mesmo com a melhora dos métodos de coleta e processamento do soro, que possibilitaram a eliminação de contaminantes exógenos, certas viroses podem permanecer e, os métodos de inativação pelo calor ou radiação gama não são inteiramente eficazes na eliminação da contaminação vírica (PALASZ & DEL CAMPO et al., 1995).

A utilização do soro de égua na PIV de embriões bovinos pode ser uma alternativa para se evitar a contaminação dos embriões através da utilização de materiais de origem bovina como células, soro e componentes dele extraídos, que podem ser fontes potenciais de BVD (diarréia viral bovina - ROSSI et al., 1980; GUERIN et al., 1997; BROCK, 1998; STRINGFELLOW et al., 2000). O soro equino é livre de atividade neutralizante de alguns vírus, como o da BVD e por isto é utilizado para pesquisa da transmissibilidade de patógenos pela PIV (GIVENS et al., 1998, 1999a, 1999b, 2000; STRINGFELLOW et al., 1999).

Sabe-se que a égua, diferente do que se é encontrado na vaca, não tem um pico pré-ovulatório de LH; a concentração deste hormônio aumenta durante o estro chegando ao pico um a três dias após a ovulação. Com isso, supôs-se que seria possível

produzir embriões, com taxas razoáveis, utilizando-se como fonte proteica o soro de égua em estro sem a necessidade da suplementação com LH/FSH durante o processo de maturação dos oócitos, como se realiza na maioria dos protocolos de maturação (BRUM, 2000; BRUM et al., 2001b; FIGUEIRÓ et al., 2000; GORDON, 1994).

Este experimento teve como base os resultados obtidos em pesquisas realizadas no Laboratório de Embriologia e Reprodução Animal da Universidade Federal de Santa Maria (EMBRYOLAB). Tais pesquisas valiam-se do soro de égua em estro como fonte proteica para a produção *in vitro* de embriões bovinos (FIGUEIRÓ et al., 2000). Baseou-se também na dificuldade encontrada em repor os estoques de hormônios, principalmente LHb e rFSHh que são rotineiramente utilizados no processo de maturação dos oócitos, já que estes, em muitas situações, não são encontrados para comercialização.

O objetivo deste experimento foi de verificar a eficiência do soro de égua sem a suplementação com LH/FSH na produção *in vitro*. Para, com isso, tornar-se uma alternativa para diminuir os custos dos protocolos de PIV com a não utilização destes hormônios e também simplificar a manipulação dos meios, que em laboratórios com grande rotina e com vários pesquisadores seria uma maneira eficiente da otimização da utilização dos materiais.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do soro

O soro foi obtido de três éguas e coletado sempre no primeiro dia do estro, que era confirmado pela avaliação do comportamento do animal durante a rufiação, pela palpação retal e ultra-sonografia. O sangue foi coletado em tubos de ensaio com vácuo sendo mantido nestes até a retração do coágulo, à temperatura ambiente. Em seguida, o soro foi centrifugado em tubos cônicos de 15ml. Finalmente, o soro foi inativado em banho-maria por 30 minutos à temperatura de 56°C, filtrado, identificado e armazenado a -20°C.

O soro de vaca em estro utilizado no experimento como grupo controle tinha sua eficiência comprovada pois era o soro empregado nas demais rotinas do Laboratório de Embriologia e Reprodução Animal da Universidade Federal de Santa Maria.

Coleta dos ovários e seleção dos oócitos bovinos

Todos os ovários foram coletados em um frigorífico localizado a 30km do Laboratório onde foi efetuada a PIV e transportados em solução de 0,9% de

NaCl acrescida de 50UI/ml de Penicilina G-Potássica, à temperatura ambiente (22 a 25°C). Todos os folículos com diâmetro entre 2-8mm foram puncionados com auxílio de uma bomba de vácuo. Após a punção, os oócitos foram mantidos em líquido folicular por um período de, no máximo 20 minutos e somente foram selecionados aqueles pertencentes às categorias 1 e 2 conforme DELOOS et al. (1989).

Maturação *in vitro* dos oócitos

Após seleção, independente do tratamento, os oócitos (n=1271) foram maturados em meio TCM199 + 5,95mg/ml de Hepes, 0,025mg/ml de piruvato de sódio e 2,2mg/ml de bicarbonato de sódio, sem a adição de hormônios (ES e VS), adicionado 0,5mg/ml de hormônio luteinizante bovino (LHb) + 0,01UI/ml de hormônio foliculo estimulante recombinante humano (rFSHh) ao EH e, adicionado também 0,5mg/ml de hormônio luteinizante bovino (LHb) + 0,01UI/ml de hormônio foliculo estimulante recombinante humano (rFSHh) ao VH.

Após a lavagem, os oócitos foram colocados nos respectivos tratamentos em número de 30 a 40 oócitos por poço em placas de cultivo de quatro poços contendo 400ml de meio de maturação e levados à estufa com 5% de CO₂ à temperatura de 39°C e umidade saturada por 22 a 24 horas.

Fecundação *in vitro* dos oócitos

Após este período de maturação, os oócitos foram transferidos para placas de quatro poços contendo 400ml de meio TALP-FERT, adicionado de 20mg/ml de heparina, 6mg/ml de BSA e 0,22mg/ml de piruvato de sódio que era estabilizado em estufa duas horas antes.

Na fecundação, foi utilizado sêmen congelado de touros *Bos taurus*. O descongelamento foi realizado a 39°C por 20 segundos, sendo depositado em 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 dos espermatozoides ("swim up"). 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 co-cultivo dos oócitos e espermatozoides foi de 18 a 22 horas sob as mesmas condições da maturação.

Cultivo *in vitro* dos embriões

Após a fecundação, os oócitos/zigotos eram transferidos para 400µl de meio SOF acrescido

de 20µl de aminoácidos essenciais, 10µl de aminoácidos não-essenciais (TAKAHASHI & FIRST, 1992) + 5% soro de vaca em estro (VS e VH) ou soro de égua em estro (ES e EH), conforme o tratamento e submetidos a um processo de agitação mecânica para o desnudamento (liberação das células do *Cumulus oophorus*). Em seguida os oócitos/zigotos foram lavados no meio de cultivo e transferidos para placas de 400µl com meio SOF acrescido do respectivo soro, sob óleo para imediatamente submetê-los ao cultivo em estufa à 39°C, com 5% de CO₂ e umidade saturada por 8 dias.

No 2º dia (D2) após a inseminação foi feita a avaliação da clivagem, quando se observou o número de embriões com duas ou mais células. No 7º dia (D7) após a fecundação, foi efetuada a avaliação dos blastocistos e, 48 horas após (D9), foi novamente avaliado o número embriões no estágio de blastocisto ou estágios mais avançados e a taxa de eclosão.

Contagem do número de células

Depois da avaliação do D9, uma amostra dos embriões foram fixados em paraformaldeído a 2% em PBS para a realização da contagem do número de células através de coloração dos núcleos com corante Hoescht para visualização em microscópio de epifluorescência com filtro de excitação (365nm) e filtro barreira (410nm).

Análise estatística

Foram feitas nove repetições, em que os oócitos selecionados eram divididos aleatoriamente em quatro grupos de 30 a 40 oócitos por poço. Para analisar o efeito dos tratamentos sobre a produção de embriões, foi utilizado o teste do qui-quadrado (p<0,05) e, para analisar o efeito dos tratamentos sobre o número de células, foi utilizado o teste de Tukey, sendo tirada a raiz quadrada dos dados para normalizá-los. Os dados foram analisados, utilizando-se o pacote estatístico SAS (1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa média de clivagem obtida neste experimento foi de 73%; o percentual de embriões em D7 foi de 27% e em D9 foi de 27%. A taxa de eclosão em D9 foi de 9% (Tabela 1). Estes resultados são compatíveis com os obtidos em experimentos anteriores obtidos no Laboratório e também com os relatados na literatura. TAKAHASHI & FIRST (1992), FIGUEIRÓ et al. (2000), LEHMKUHL et al. (2000), FORREL et al. (2000) e HOLM et al. (1999) citam taxas médias de clivagem que variam de 70% a 86%, que não

Tabela 1 – Produção *in vitro* de embriões bovinos com soro de égua ou de vaca em estro com ou sem a adição de LH e FSH.

Tratamentos	Oócitos n	Clivagem n (%)	D7 n (%)	D9 n (%)	Eclusão n (%)
ES	317	254 (80,1) ^a	100 (31,5) ^a	97 (30,6) ^a	35 (11,0) ^a
EH	323	257 (79,8) ^a	90 (27,9) ^a	95 (29,4) ^a	34 (10,5) ^a
VS	315	193 (61,3) ^a	63 (20,0) ^b	68 (21,6) ^b	30 (9,5) ^a
VH	316	229 (72,5) ^a	85 (26,9) ^a	76 (24,0) ^{a,b}	16 (5,1) ^b
Total	1271	933 (73,4)	338 (26,6)	336 (26,4)	115 (9,0)

^{a,b} Letras diferentes nas colunas diferem significativamente ($p < 0,05$)

ES = maturado com TCM199 + soro de égua em estro

EH = maturado com TCM199 + soro de égua em estro + LH/FSH

VS = maturado com TCM199 + soro de vaca em estro

VH = maturado com TCM199 + soro de vaca em estro + LH/FSH

diferem das encontradas neste experimento. Também não foram encontradas diferenças significativas nas taxas de clivagem entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos em D7 neste experimento foram satisfatórios quando comparados aos de outros autores (TAKAHASHI & FIRST (1992) - 20%; FIGUEIRÓ et al. (2000) - 21%; FORREL et al. (2000) - 16%; BRUM et al. (2000) - 13%) e também aos obtidos por BRUM (2001a). Os tratamentos ES, EH e VH diferiram estatisticamente do VS, significando que quando se utiliza soro de égua, a adição de LH/FSH não aumenta a produção de embriões, mas quando se utiliza como fonte proteica o soro de vaca em estro, esta adição se faz necessária.

Quando se compararam os resultados obtidos em D9, verificou-se que os tratamentos ES e EH foram estatisticamente superiores ao VS, mas não foram diferentes do VH. As taxas de blastocistos que foram obtidas em D9, neste experimento, se equiparam às encontradas na literatura (LEHMKUHL et al. (2000) - 20%; FORREL et al. (2000) - 25%; FIGUEIRÓ et al. (2000) - 21%; HOLM et al. (1999) - 42%.

As taxas de eclusão dos tratamentos ES, EH, VS foram superiores a do tratamento VH, mas não diferiram das encontradas em outros experimentos realizados no Laboratório.

O número médio de células dos blastocistos expandidos e eclodidos dos diferentes tratamentos são mostrados na tabela 2. Não houve diferença significativa entre os tratamentos e as médias obtidas são similares àquelas relatadas na literatura para blastocistos expandidos e eclodidos em D9 (JIANG et al., 1992 - 67 células para blastocistos expandidos; LONERGAN et al., 1992 - 105 células para blastocistos expandidos e 204 para blastocistos eclodidos; AVERY & QUETGLAS, 1996 - 133 células para blastocistos expandidos; BRUM et al., 2000 - 94 células para blastocistos expandidos e 200 células para blastocistos eclodidos). Em outro trabalho realizado

pela equipe do presente trabalho, com soro de égua no primeiro dia do estro e de vaca em estro como fontes proteicas, encontraram-se, respectivamente, médias de 129 e 136 células por blastocisto.

O uso de fontes proteicas de origem animal na produção de embriões *in vitro* está diretamente ligado ao risco de introdução e transmissão de agentes infecciosos que possam estar presentes nestes materiais. Porém, os resultados obtidos na produção *in vitro* de embriões com protocolos sem a utilização de soro são, em geral inferiores (PINYOPUMMINTR & BAVISTER, 1991; KIN et al., 1993; MARQUANT-LEGUIENE & HUMBLLOT, 1998; HOLM et al., 1999; THOMPSON, 1999;).

Vários grupos de pesquisa estão trabalhando para conseguir definir e sintetizar os componentes essenciais, que fornecem nutrientes e fatores ainda pouco conhecidos ou desconhecidos para a maturação, fecundação e cultivo *in vitro* (BROCK, 1998). Por outro lado, deve-se ter sempre presente o fato de que fontes proteicas derivadas de soro bovino comercializadas no mercado podem conter bactérias e vírus acidentais (BVDV, BHV-1, IBR e PI-3 bovina) e, sempre que utilizadas, podem estar contaminadas, ao menos, com BVDV, constituindo assim possíveis riscos na disseminação e transmissão destes agentes, principalmente quando estas técnicas podem ser associadas com o congelamento dos embriões, células ou constituintes do soro e comercializadas (KNIAZEFF et al., 1975; ROSSI et al., 1980; ERICKSON et al., 1991; BOLIN et al., 1991; BROCK, 1998; ROEHE et al., 1998).

O fato de o grupo com soro de vaca em estro ter apresentado valores significativamente inferiores ao dos tratamentos que utilizaram soro de égua em estro com e sem LH/FSH e de vaca com FSH/LH, indica, por um lado, que os níveis de FSH/LH necessários a PIV são de antemão suficientes no soro de égua em estro e, por outro, que esses níveis são

Tabela 2 - Número médio de células, visualizadas em epifluorescência e coloração por Hoechst, de embriões bovinos produzidos *in vitro* com soro de égua ou de vaca em estro com ou sem a suplementação com LH/FSH.

Tratamentos	Número de células			
	Blastocistos expandidos		Blastocistos eclodidos	
	n	Média	n	Média
EH (n=23)	11	65,5 ^a	12	93,3 ^a
ES (n=20)	7	74,7 ^a	13	88,8 ^a
VH (n=17)	11	69,5 ^a	6	83,2 ^a
VS (n=21)	12	83,8 ^a	9	106,8 ^a

^{a,b} Letras diferentes nas colunas diferem significativamente (p<0,05)

ES = maturado com TCM199 + soro de égua em estro

EH = maturado com TCM199 + soro de égua em estro + LH/FSH

VS = maturado com TCM199 + soro de vaca em estro

VH = maturado com TCM199 + soro de vaca em estro + LH/FSH

insuficientes no soro de vaca em estro utilizado neste experimento. Esse fato elimina a necessidade de utilização de FSH/LH quando usado soro de égua em estro na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Este experimento não tem o intuito de descartar as funções do LH/FSH na maturação dos oócitos bovinos, mas sim, que a adição destes hormônios quando se utiliza soro de égua em estro não exerce benefícios, pois a quantidade destes contidas nesta fração de soro talvez seja suficiente para suprir as necessidades dos oócitos, o que não foi verificado quando se utilizou como fonte proteica o soro de vaca em estro sem a adição destes hormônios.

CONCLUSÕES

Conclui-se que, com a utilização do soro de égua em estro na PIV de embriões, a metodologia torna-se mais prática e econômica, pois não há necessidade da adição de LH/FSH durante o processo de maturação. Entretanto, estes hormônios devem ser adicionados quando se utilizar soro de vaca em estro para que se obtenham taxas equivalentes de blastocistos na produção *in vitro* de embriões bovinos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a PECPLAN-ABS de Rosário do Sul, RS, pelo fornecimento do sêmen utilizado, ao Frigorífico Silva pela cedência dos ovários, ao Setor de Suínos da FaVet - UFRGS pela cedência do microscópio de epifluorescência e de suas instalações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVERY, B.; QUETGLAS, D. Evolution of day 8 and 9 *in vitro* derived bovine blastocysts, fertilized with two

different bulls. **Theriogenology**, v.45, n.1, p.213, 1996.

BOLIN, S.R.; MATTHEWS, P.J.; RIDPATH, J.F. Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhoea virus and antibodies against bovine viral diarrhoea virus. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.3, n.3, p.199-203, 1991.

BROCK, K.V. Quality control for materials of animal origin used in embryo production and transfer. In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. (eds). **Manual of the International Embryo Transfer Society**. Savoy, IL: IETS, 1998. p.135-140.

BRUM, D.S. **Transporte-cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro***. 2000. n.i. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

BRUM, D.S. Comunicação pessoal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, endereço eletrônico: danibrum@lince.hcv.ufsm.br, 2001a.

BRUM, D.S. et al. Transporte-cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arquivos da Fac de Veterinária UFRGS, no prelo** (2001b).

DELOSS, F. et al. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, v.24, p.197-204, 1989.

ERICKSON, G.A.; BOLIN, S.R.; LANDGRAF, J.G. Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns. **Dev Biol Stand**, v.75, p.173-175, 1991.

FIGUEIRÓ, G.M. et al. O soro equino na PIV de embriões bovinos: I. Análise do soro de égua em diferentes estágios do cio. **Arquivos da Fac de Veterinária UFRGS**, v.28, p.258, 2000, (Supl.).

FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Produção *in vitro* de embriões bovinos adicionando glicose em diferentes momentos do cultivo. **Arquivos da Fac de Veterinária UFRGS**, v.28, p.267, 2000, (Supl.).

GIVENS, M.D. et al. Bovine viral diarrhoea virus was not

- detected in association with virally exposed IVF bovine embryos. **Theriogenology**, v. 9, n.1, p.252, 1998.
- GIVENS, M.D. et al. Bovine viral diarrhoea virus associated with IVF embryos does not infect susceptible cells. **Theriogenology**, v.51, n.1, p.271, 1999a.
- GIVENS, M.D. et al. Quantity and infectivity of embryo-associated bovine viral diarrhoea virus and antiviral influence of a blastocyst impede *in vitro* infection of uterine tubal cells. **Theriogenology**, v.52, p.887-900, 1999b.
- GIVENS, M.D. et al. Potential for noncytopathic strains of bovine viral diarrhoea virus to associate with IVF embryos and remain infective. **Theriogenology**, v.53, n.1, p.319, 2000.
- GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryo**. Cambridge : CAB International, 1994. p.640.
- GUERIN, B. et al. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic animals. **Theriogenology**, v.47, p.33-42, 1997.
- 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**, v.52, n.683-700, 1999.
- JIANG, H.S. et al. Examination of cell numbers of blastocysts derived from IVM, IF and IVC bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, v.37, n.1, p.229, 1992.
- KIM, J.H. et al. 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. **Biol Reprod**, v.48, n.6, p.1320-1325, 1993.
- KNIAZEFF, A.J. et al. Detection of bovine viruses in fetal bovine serum used in cell culture. **In vitro**, v.11, n.6, p.400-403, 1975.
- LEHMKUHL, R.C. et al. Desenvolvimento de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular e submetidos a FIV. **Arquivos da Fac de Veterinária UFRGS**, v.27, p.276, 2000, (Supl.).
- LONERGAN, P.; FAIR, T.; GORDON, I. 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: CONFERENCE OF THE EUROPEAN EMBRYO TRANSFER ASSOCIATION, 1992, Lyon. **Proceedings...** Lyon : n.i., 1992. p.178.
- MARQUANT-LEGUIENNE, B.; HUMBLOT, P. Practical measures to improve *in vitro* blastocyst production in the bovine. **Theriogenology**, v.49, p.3-11, 1998.
- PALASZ, A.T.; DEL CAMPO, M. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Recent advances. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES – BIOTECNOLOGIA Y TECNOLOGIA AVANZADAS, 1995, Montevideo, Uruguay. **Anais...** Montevideo : n.i., 1995. p.78-85.
- PINYOPUMMINTR, T.; BAVISTER, B.D. *In vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. **Biol Reprod**, v.45, n.5, p.736-742, 1991.
- ROEHE, P.M. et al. A situação do vírus da Diarréia Viral Bovina no país. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVIRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS : UFSM, 1998. p.39-48.
- ROSSI, C.R.; BRIDGMAN, B.S.; KIESEL, G.K. Viral contamination of bovine fetal lung cultures and bovine fetal serum. **Am J Vet Res**, v.41, p.1680-1681, 1980.
- SAS Institut (CARYNC NC) **SAS user's guide**: Estatistical Analysis System release 6.12. Cary, 1998.
- STRINGFELLOW, D. A. et al. Quality controls for bovine viral diarrhoea virus-free IVF embryos. **Theriogenology**, v. 51, n.1, p.275, 1999.
- STRINGFELLOW, D.A. et al. Quality controls for bovine viral diarrhoea virus-free IVF embryos. **Theriogenology**, v.53, p.827-839, 2000.
- TAKAHASHI, Y.; FIRST, N.L. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. **Theriogenology**, v.37, p.963-978, 1992.
- THOMPSON, J.G. Cultura *in vitro* de embriões bovinos: novas técnicas e conseqüências pós-transferência. **Arquivos da Fac de Veterinária UFRGS**, v.27, p.133-146, 1999, (Supl.).