

Cultivo individual de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*

Individual culture of *in vitro* produced bovine blastocysts

Daniela dos Santos BRUM¹; Fábio Gallas LEIVAS¹, Mari Lourdes BERNARDI²,
Lúcio Pereira RAUBER¹; Alceu MEZZALIRA¹; Karin Erica BRASS¹;
Carlos Antonio Mondino SILVA¹; Mara Iolanda Batistella RUBIN¹

CORRESPONDENCE TO:
MARA IOLANDA BATISTELLA RUBIN
Laboratório de Embriologia e Reprodução
Animal - EMBRYOLAB
Departamento de Clínica de Grandes Animais
Centro de Ciências Rurais - UFSM
97105-900 - Santa Maria - RS
E-mail: mrubin@lince.hcv.ufsm.br

1- Laboratório de Embriologia e
Reprodução Animal, DCGA, CCR da
UFSM, Santa Maria – RS
2- Departamento de Zootecnia da
Faculdade de Agronomia da UFRGS, Porto
Alegre – RS

RESUMO

Embriões bovinos produzidos *in vitro* foram cultivados individualmente do D7 ao D9, com o intuito de avaliar o seu desenvolvimento posterior. Quarenta e nove embriões, nos estágios de blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido foram cultivados, individualmente, em 50ml de meio SOF + 5% SVE, do D7 ao D9 (D0=fecundação). Entre o D7 e D8, os blastocistos foram cultivados em palhetas (TcP) ou em placas (CP) e, entre o D8 e D9, foram cultivados apenas em placas. O índice de blastocistos que avançaram pelo menos um estágio de desenvolvimento, entre D7 e D8, foi de 71%, 37% e 44% no CP e de 100%, 66% e 36% no TcP, respectivamente para blastocistos iniciais, blastocistos e blastocistos expandidos. O percentual total de embriões que evoluíram do D7 para D8 foi de 50% (12/24) para o CP e de 60% (15/25) para o TcP, os quais não foram significativamente diferentes ($P>0,05$). Na avaliação efetuada no D9, não foram constatadas diferenças ($P>0,05$) no percentual de blastocistos eclodidos, entre os dois sistemas de cultivo (29% e 24% para CP e TcP, respectivamente). Após coloração fluorescente dos núcleos, não foi observada diferença ($P>0,05$) entre o número médio de células dos blastocistos eclodidos (182,66 vs. 202,8) e expandidos (94,5 vs. 88), para o CP e TcP, respectivamente. Blastocistos bovinos produzidos *in vitro* podem ser cultivados individualmente do D7 ao D9, não havendo efeito do sistema de cultivo empregado (placas ou palhetas) sobre a taxa de eclosão e o número de células.

PALAVRAS-CHAVE: Embrião. Bovinos. Cultura de embriões animal.

INTRODUÇÃO

Estudos realizados até o momento mostram excelentes progressos nos resultados atingidos com a produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV). Nesta última década, as taxas de produção embrionária se estabilizaram em torno de 35% de blastocistos no sétimo dia de cultivo^{7-12, 13}, variando entre laboratórios. A qualidade destes embriões ainda encontra-se bastante variável devido aos diferentes protocolos utilizados.

O cultivo de embriões ainda é um dos passos da produção *in vitro* que vem sendo estudado e o qual é importante para que sejam obtidas boas taxas de desenvolvimento de embriões viáveis. De modo geral, o cultivo ainda é realizado em grupos, estando associado a melhores taxas finais de blastocistos. O tamanho destes grupos varia entre 20 a 40 embriões por gota ou poço, proporcionando desta forma uma maior concentração de fatores de crescimento produzidos pelos próprios embriões que, através de ação autócrina e parácrina, proporcionam um maior desenvolvimento embrionário. Contudo, menores densidades de embriões por volume de meio propiciam uma

maior diluição de possíveis substâncias tóxicas para os embriões¹¹.

Com a utilização comercial da PIV, a necessidade de reduzir o tamanho destes grupos, tornou-se fundamental, uma vez que a média de oócitos aspirados gira em torno de 10 por sessão de OPU (*Ovum Pick-Up*). O cultivo individual destes embriões, a partir de estágios mais avançados, também facilitaria o transporte dos mesmos, na própria palheta de envase, de modo a serem transferidos sem a necessidade de manipulação prévia. Este trabalho teve como objetivo comparar o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*, cultivados individualmente, em placas e em palhetas.

MATERIAL E MÉTODO

Os embriões utilizados neste trabalho foram produzidos a partir de oócitos de ovários de matadouro transportados até o laboratório em temperatura entre 22 e 25°C²⁶, em solução fisiológica a 0,9% de NaCl acrescida de 100mg de estreptomicina¹ e 50.000UI de penicilina G-Potássica^a para um litro de solução, em tempo não superior

a duas horas após o término do abate. Os folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm foram puncionados com o auxílio de uma bomba de vácuo² e os oócitos aspirados foram mantidos em líquido folicular para a busca sob estereomicroscópio. Após a identificação, os oócitos foram imediatamente selecionados de acordo com o aspecto morfológico dos Complexos Cumulus-Oócitos (CCOs), conforme o critério de avaliação descrito por DeLoos et al.⁴. A maturação foi realizada em 400mL de TCM-199³ modificado, adicionado de 5,95mg/mL de HEPES^a, 0,025mg/mL de piruvato de sódio^a, 0,01UI de rFSHh^d/mL 0,5mg/mL de LH⁵ e 10% de soro de vaca em estro (SVE), por 22 a 24 horas em estufa de cultivo à temperatura de 39°C, com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. Para a fecundação foi utilizado sêmen congelado de um pool de touros *Bos taurus*. Cada palheta de 0,5mL de sêmen foi descongelada a 39°C por 20 segundos e o sêmen submetido ao processo de “swim-up” em meio TALP-SPERM, acrescido de 0,06mg/mL BSA^a e 0,11mg/mL de piruvato de sódio. A dose inseminante foi de 1x10⁶ espermatozoides/mL. A incubação dos oócitos/espermatozoides foi conduzida em 400mL de meio TALP-FERT com 0,06mg/mL de BSA e 0,022mg/mL de piruvato de sódio em estufa de cultivo a 39°C, com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada, por um período de 18 a 22 horas

Após este período, os supostos zigotos foram desnudados através de agitação em vortex^{6,f} e cultivados em 400mL de meio de cultivo SOF contendo 5% de soro de vaca em estro, 20mL/mL de aminoácidos essenciais^a e 10mL/mL de aminoácidos não-essenciais^a, onde permaneceram por 6 dias, em gotas de 400mL em placas de cultivo de quatro poços, sob óleo mineral^a, mantidos em estufa de cultivo à temperatura de 39°C, com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

Para o transporte-cultivo individual do D7-D9 de embriões bovinos produzidos *in vitro*, quarenta e nove (49) embriões, nos estágios de blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido, obtidos no D7 após FIV, foram distribuídos aleatoriamente, nos dois tratamentos, referentes à forma de cultivo de embriões.

· Cultivo em Placa (CP): os embriões foram distribuídos individualmente, em gotas de 50mL de meio SOF acrescido de 5% de SVE sob óleo mineral, em placas de Petri (35 x 10 mm), sendo colocadas a seguir em estufa de cultivo a 39°C, com 5% de CO₂ em ar, com umidade saturada, por um período de 24 horas (grupo controle).

· Transporte-cultivo em Palheta (TcP): os embriões foram envasados individualmente em palhetas de 0,25mL com 50mL de meio SOF acrescido de 5% SVE. Estas palhetas foram depositadas em tubo de ensaio aberto para gaseificação através da permanência dentro da estufa de cultivo por um período de duas horas, antes do mesmo ser fechado, para a simulação do transporte em laboratório, a 39°C por 24 horas (grupo transporte).

Dos 49 blastocistos utilizados, 24 foram cultivados no sistema CP e 25 no TcP, pelo período de 24h, entre D7 e D8. Após o período de transporte-cultivo, simulado no laboratório por 24 horas, os embriões do TcP e CP, já em D8, foram avaliados quanto ao estágio de desenvolvimento. Após esta avaliação no D8, os embriões foram colocados novamente na estufa de cultivo, individualmente, em placas, até o D9, quando foram submetidos à nova avaliação para determinar a taxa de desenvolvimento embrionário. Foram considerados como desenvolvidos os embriões que alcançaram pelo menos o estágio de blastocisto expandido, durante os dois dias de cultivo. Os embriões que já se encontravam no estágio de blastocisto expandido no D7 e que não mudaram de estágio, não foram considerados como desenvolvidos.

Após a avaliação da taxa de desenvolvimento, os embriões foram fixados em paraformolaldeído a 2%, para a realização da contagem do número de células coradas com Hoechst^a na concentração final de 10 mg/mL de PBS salino. A visualização foi efetuada em microscópio de epifluorescência equipado com filtro de excitação (365nm) e filtro de barreira (410nm).

Os blastocistos obtidos no D7 foram submetidos aos dois tratamentos, em um delineamento experimental inteiramente casualizado. Foram efetuadas 3 repetições, em dias diferentes, sendo os tratamentos realizados simultaneamente. Para o cálculo da taxa de desenvolvimento embrionário, foram considerados os embriões que avançaram pelo menos um estágio de desenvolvimento, primeiramente entre D7 e D8 e, em seguida, do D7 ao D9. Para analisar o efeito dos tratamentos ou o efeito do estágio embrionário inicial sobre a proporção de embriões que se desenvolveram em cultivo, foi utilizado o teste do Qui-quadrado ou o Teste de Fisher. O número médio de células dos embriões foi comparado através do Teste t, após terem sido submetidos à transformação logarítmica. Para avaliar a correlação existente entre o estágio de desenvolvimento dos embriões em D9 e o número de células, foi utilizada a correlação de Pearson.

^a Sigma Chemical CO.- P.O. Box 4508, MO, USA.

^b Nevoni Equipamento Odonto Médico Hospitalar Ltda – Rua Dom João V, 266/280 Lapa 05.075.060 São Paulo, SP, Brasil.

^c Cutilab Materiais para Cultivo de Células Ltda - Rua Maria Monteiro, 177 Cambuí 13.025-150 Campinas, SP, Brasil.

^d Serono Pharma S.p.A.– 70123, Bari, Itália.

^e Lutogen - Ausa International Inc. 12872 HWY.155 Bldg.15, Tyler, TX., USA.

^f Fanem Ltda – Av. General Ataliba Leonel, 1790 – Bairro Carandirú 02.033.020 São Paulo, SP, Brasil.

RESULTADOS

Os percentuais de blastocistos que evoluíram em pelo menos um estágio de desenvolvimento, entre D7 e D8, são apresentados na Fig. 1. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) na taxa de desenvolvimento, entre os dois sistemas de cultivo, sendo que o percentual total de embriões que evoluíram do D7 para D8 foi de 50% (12/24) para o CP e de 60% (15/25) para o TcP. Após o término do cultivo individual, realizado de D7 a D8, os embriões retornaram ao cultivo em placa, novamente de forma individual, até o D9. As taxas de desenvolvimento embrionário, do D7 ao D9, não foram

diferentes ($P>0,05$) para os dois sistemas de cultivo utilizados entre D7 e D8 (Fig. 2). O número médio, mínimo e máximo de células dos blastocistos eclodidos, blastocistos expandidos e blastocistos degenerados, obtidos nas diferentes formas de cultivo, são apresentados na Tabela 1. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre o cultivo em placa e em palheta, quando foi comparado o número médio de células dos blastocistos eclodidos (182,7 vs. 202,8), blastocistos expandidos (94,5 vs. 88,0) e blastocistos não transferíveis (30,0 vs. 30,6). Foi verificada uma correlação positiva ($r^2=0,71$) e significativa ($p<0,01$) entre o estágio de desenvolvimento embrionário em D9 e o número de células.

Tabela 1

Número médio de células, visualizadas por coloração fluorescente com Hoechst, nos blastocistos bovinos produzidos *in vitro* e cultivados individualmente, Santa Maria, RS – 1999

Tratamento	Número de células		
	Blastocistos Eclodidos	Blastocistos Expandidos	Blastocistos não transferíveis
Cultivo em placa (n = 12)	182,7 (157-217) n=3	94,5 (75-115) n=4	30,0 (2-51) n=5
Transporte-cultivo em palheta (n = 21)	202,8 (128-345) n=5	88,0 (67-119) n=11	30,6 (2-52) n=5
Total (n = 33)	192,7 (128-345) n=8	91,2 (67-119) n=15	30,3 (2-52) n=10

($P>0,05$)

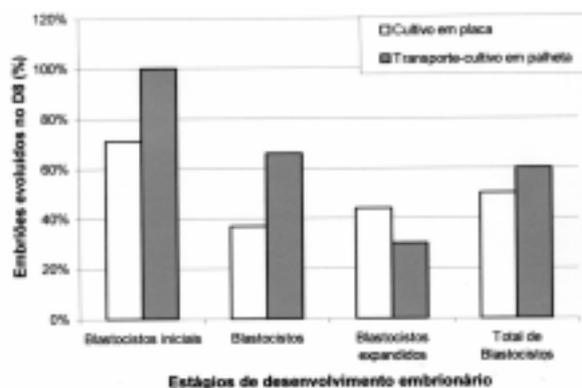


Figura 1

Desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*, do D7 até D8 (D0=dia da fecundação), nos diferentes estágios após cultivo individual, em placa ou em palheta.

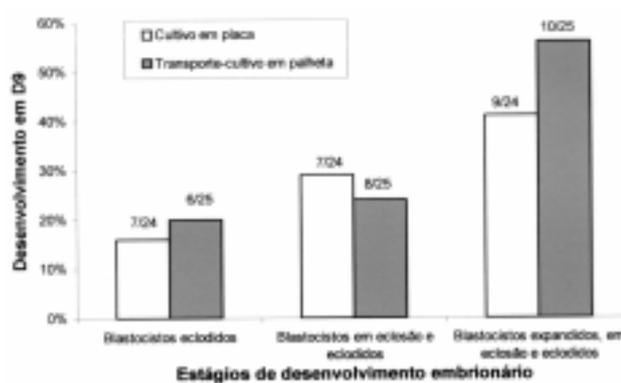


Figura 2

Desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* e cultivados individualmente a partir do D7 (D0=fecundação), em placa ou palheta até o dia 8, e em placa até o D9.

DISCUSSÃO

O número de embriões relativo ao volume de meio de cultivo é bastante variável entre laboratórios. Com a

utilização comercial da PIV, a necessidade de adaptar o volume e a densidade de embriões por gota de cultivo tornou-se fundamental, uma vez que nos programas de OPU trabalha-se com um número limitado de doadoras e diferentes touros

para fecundação^{15, 27}.

Estudos realizados em camundongos^{19, 20} e ovelhas⁶ demonstraram que embriões cultivados em grupos resultam em melhor desenvolvimento, quando comparados com o cultivo individual. Em bovinos, este comportamento é semelhante, apresentando taxas de desenvolvimento embrionário superiores para os cultivados em grupos^{4, 17}.

Em ambas as avaliações efetuadas no presente estudo foi possível constatar que o cultivo de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* pode ser efetuado em placas ou palhetas. A manutenção dos blastocistos em palhetas possui a vantagem de ser um sistema mais prático para que os embriões continuem o seu desenvolvimento enquanto são transportados, mesmo a longas distâncias, para serem transferidos.

O desenvolvimento embrionário no D8 foi superior (84%), quando os embriões do D7 estavam no estágio de blastocisto inicial, em comparação aos estágios de blastocisto (59%) ou blastocisto expandido (28%). O fato dos blastocistos iniciais terem apresentado um desenvolvimento embrionário superior aos outros dois estágios, não significa que este deva ser o estágio escolhido para se realizar um cultivo individual. Esta observação apenas confirma que as condições de cultivo *in vitro* podem ser mais limitantes para estágios mais avançados pois é mais difícil, por exemplo, para um blastocisto expandido chegar à eclosão do que para um blastocisto inicial se desenvolver até o estágio de blastocisto ou blastocisto expandido, durante um período de cultivo de 24h.

Até a presente data, a maioria das pesquisas realizadas com cultivo individual de blastocistos produzidos *in vitro*, tem como o objetivo o transporte destes embriões, utilizando a temperatura ambiente ou meios de manutenção^{5, 16, 21} que não propiciam um desenvolvimento adequado aos embriões. Já nos trabalhos que utilizaram temperaturas entre 38 e 39°C e meios de cultivo, o transporte foi realizado em grupos e a avaliação do desenvolvimento no D8 não foi efetuada, sendo o sistema de transporte avaliado apenas pela taxa de eclosão ou taxa de prenhez^{18, 23}. Devido a estes fatores, é difícil determinar se as taxas médias de evolução obtidas no D8, no presente estudo, estão de acordo com o esperado, pois as informações neste sentido são escassas ou, em alguns aspectos, como o cultivo individual entre D7 e D9, inexistentes.

Os dois sistemas de cultivo foram igualmente eficazes no que se refere ao número de blastocistos em eclosão e blastocistos eclodidos obtidos. As taxas de eclosão obtidas no presente estudo são inferiores às citadas na literatura e referentes ao transporte em meios de manutenção e temperatura ambiente, as quais variam de 44 a 62%^{5, 21}. No entanto, a avaliação da taxa de eclosão no presente estudo foi efetuada no D9, ou seja, após 48 horas de cultivo individual, enquanto nos outros estudos, a mesma foi efetuada 72 horas após o transporte simulado²¹ ou não é reportado o momento em que a taxa de eclosão é avaliada⁵, o que poderia explicar os resultados mais elevados obtidos

por esses autores.

Segundo Gordon⁸, o número de células de embriões bovinos produzidos *in vitro* pode ser considerado um indicador da viabilidade destes embriões. Jiang et al.¹⁰ verificaram um número médio de 67 células nos blastocistos expandidos, inferior ao observado no presente estudo para os blastocistos expandidos obtidos com o TcP e CP (88 e 94, respectivamente). Números ainda mais elevados (105 e 133, respectivamente) foram citados por Lonergan et al.¹⁴ e Avery e Quetglas². O número médio de células de blastocistos eclodidos é bastante variável, sendo que Lonergan et al.¹⁴ reportaram o valor de 204 enquanto Van Somm et al.²⁵ reportaram números de 93 para os blastocistos cultivados em TCM-199 e de 138 para os cultivados em meio MENEZO B2. Esta variação ocorre provavelmente em função das diferentes metodologias e composição dos meios de cultivo empregados até o momento da avaliação final. Os valores verificados no presente estudo foram de 203 para os blastocistos eclodidos obtidos no sistema de cultivo em palhetas, e de 183 para os obtidos no sistema de cultivo em placas. Considerando a variabilidade inerente ao número de células, citada anteriormente, os valores observados estão dentro da faixa reportada na literatura sugerindo, no que se refere a este aspecto, que as condições de cultivo foram satisfatórias. No presente estudo, também foi evidenciada, como esperado, uma correlação positiva e altamente significativa do número de células com o estágio de desenvolvimento.

Embora se saiba que até o D7 há uma grande divergência nos resultados que envolvem o cultivo individual^{1, 9, 22}, a média de produção embrionária *in vitro* é reduzida quando se cultiva embriões individualmente, ao contrário do que ocorre quando o cultivo é conduzido em grupo, indicando que existe uma interação entre os mesmos e um estímulo ao desenvolvimento, sobretudo em função de fatores de crescimento secretados pelos embriões^{1, 22}. Devido à escassez de estudos, não se sabe o quanto o cultivo individual pode ser prejudicial para embriões em estágios mais avançados e se há um volume no qual os prejuízos sejam menores. No presente estudo, não se sabe se o volume utilizado (50mL) para o cultivo individual influenciou o desenvolvimento dos embriões. Embora não tenha sido comparado ao cultivo em grupo, as taxas de desenvolvimento final (29% para o CP e 24% para o TcP) são semelhantes às observadas em experimento, onde o cultivo entre D8 e D9 foi realizado em grupo³. Isto sugere que, nas condições utilizadas, se o cultivo individual trouxe algum prejuízo, este ocorreu entre D7 e D8 e não é necessariamente recuperado por um cultivo em grupo posterior. Considerando o desenvolvimento recente da técnica WOW²⁴, a qual consiste em confeccionar depressões de 300µm nos poços das placas Nunc, de modo que os embriões possam ser cultivados individualmente, mas compartilhando o mesmo meio, seria importante averiguar se este sistema de cultivo seria vantajoso para estágios mais avançados, como os utilizados no presente estudo.

CONCLUSÃO

Blastocistos bovinos produzidos *in vitro* podem ser cultivados individualmente do D7 ao D9, não havendo efeito do sistema de cultivo empregado (placas ou palhetas) sobre a taxa de eclosão e o número de células.

AGRADECIMENTOS

À PECPLAN-ABS Rosário do Sul, RS, pela assistência técnica e auxílio no preparo do sêmen e ao Frigorífico Silva que gentilmente cedeu os ovários

SUMMARY

In vitro produced bovine embryos were individually cultured from D7 to D9 to observe their development. Forty-nine blastocysts (early blastocyst, blastocyst and expanded blastocyst) were individually cultured, from D7 to D9 (D0= fertilization), in 50ml SOF medium plus 5% OCS. Between D7 and D8, blastocysts were cultured in straws (SC) or in plates (PC) and from D8 up to D9, they were cultured on plates. The ratio of early blastocyst, blastocyst, and expanded blastocyst advancing at least one stage of development were, respectively, 71%, 37%, 44% in PC and 100%, 66%, 36% in SC (P>0.05). Overall development rates on D8 were not significantly different (P>0.05) for PC (50%) and SC (60%). At D9, both culture systems produced similar (P>0.05) hatching rates (29% and 24% for PC and SC, respectively). After fluorescent nuclei staining, the average number of cells counted in the hatched (182.7 vs. 202.8) and expanding (94.5 vs. 88.0) blastocysts were similar (P>0.05) for PC and SC, respectively. *In vitro* produced bovine blastocysts can be individually cultured from D7 to D9, and the culture system employed (dishes or straws) has no effect on hatching rates and cell number of developed blastocysts.

KEY-WORDS: Embryo. Bovine. Embryo culture.

REFERÊNCIAS

1. AHERN, T. J.; GARDNER, D. K. Culturing bovine embryos in groups stimulates blastocyst development and cell allocation to the inner cell mass. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 194, 1998.
2. 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.
3. BRUM, D. S. et al. Transporte-cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 28, n. 2, p. 36-50, 2000.
4. De LOOS F. et al. Morphology of immature bovine oocyte. **Gamete Research**, v. 24, n. 1, p. 197-204, 1989.
5. DONNISON, M.; SIMMONS, M.; THOMPSON, J.G. Increased embryo development and metabolism following short term storage of bovine IVP blastocysts at 25°C in Emcare compared to ovum culture medium. **Theriogenology**, v. 45, n. 1, p. 214, 1996.
6. GARDNER, D.K. et al. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins and cultured embryos in groups stimulate development. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 1, p. 390-400, 1994.
7. GIRITHARAN, G. et al. Effect of pre-treatment of sperm with progesterone and cholesterol on in-vitro embryo production in cattle. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 318, 1999.
8. GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryo**. Cambridge: CAB International, University Press, 1994. 640 p.
9. HAGEMAN, J.L. et al. Development of bovine embryos in single *in vitro* production (sIVP) systems. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, n. 2, p. 143-147, 1998.
10. JIANG, H. S. et al. Examination of cell numbers of blastocysts derived from IVM, IVF and IVC bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, v. 37, n. 1, p. 229, 1992.
11. KITO, S.; IRITANI, A.; BAVISTER, B.D. Effects of volume, culture media and type of culture dish on *in vitro* development of hamster 1-cell embryos. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 541-548, 1997.
12. LAZZARI, G. et al. Heparin effects on blastocyst formation and cell number of the IVM-IVF bovine embryo. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 242, 1999.
13. LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. et al. Hatching ability of *in vitro* produced cattle embryos unrelated to time of blastocoele appearance in culture. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 325, 1999.
14. 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, 8. 1992, LYON. **Proceedings...** p. 178.
15. MARQUANT-LEGUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Practical measures to improve *in vitro* blastocyst production in the bovine. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 4-11, 1998.
16. MEZZALIRA, A. et al. Transporte de embriões bovinos fecundados *in vitro*. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, p. 312, 1998. Suplemento 26.
17. O'DOHERTY, E.M. et al. Effects of culturing bovine oocytes either singly or in groups on development to blastocyst. **Theriogenology**, v. 48, n. 1, p. 161-168, 1997.
18. OLIVIER, N. S.; PALMA, G. A.; ALBERIO, R. *In vitro* production of bovine embryos in water bath. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 211, 1998.
19. PARIA, B. C.; DEY, S. K. Preimplantation embryo development *in vitro*: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. **Proceedings of National Academic Science, USA**, v. 87, n. 5, p. 4756-4760, 1990.
20. SALAHUDDIN, S. et al. Effects of embryo density and coculture of unfertilized oocytes on embryonic-development of *in vitro* fertilized mouse embryos. **Human Reproduction**, v. 10, n. 9, p. 2382-2385, 1995.

BRUM, D.S.; LEIVAS, F.G.; BERNARDI, M.L.; RAUBER, L.P.; Alceu MEZZALIRA; A.; BRASS, K.E.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Cultivo individual de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v.39, n.2, p. 87-92, 2002.

21. SCHNEIDER, M. R. et al. Short-term storage of *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 249, 1998.

22. THIBOUDEAUX, J. K.; MYERS, M. W.; HANSEL, W. The beneficial effects of incubating bovine embryos in groups are due to platelet-derived growth factor. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 336, 1995.

23. VAJTA, G. et al. The submarine incubation system: a new tool for in-vitro embryo culture-a technique report. **Theriogenology**, v. 48, n. 2, p.1379-1385, 1997.

24. VAJTA, G. et al. A new method for individual embryo culture: the well of the well (WOW) system. **Theriogenology**, v.53, n.1, p.304, 2000.

26. YANG, N. S. et al. *In vitro* fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from ovaries storage. **Theriogenology**, v. 33, n. 1, p. 352, 1990.

27. WARD, F. A.; ENRIGHT, B. P.; BOLAND, M.P. Effect of group size and oocyte to medium volume post-fertilization on the development of bovine embryos *in vitro*. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 306, 2000.

Recebido para publicação: 25/05/2001
Aprovado para publicação: 27/02/2002