

## Efeito do citrato e taurina em meio CR<sub>2</sub>aa no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro*

[Effect of citrate and taurine added to CR<sub>2</sub>aa medium on the development of *in vitro*-fertilized bovine embryos]

L.S.A. Camargo<sup>1</sup>, W.F. Sá<sup>1</sup>, J.H.M. Viana<sup>1</sup>, A.A. Ramos<sup>2</sup>, A.M. Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Gado de Leite  
Rua Eugênio do Nascimento, 610  
36038-330 – Juiz de Fora, MG

<sup>2</sup>Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, RJ

### RESUMO

Avaliou-se o efeito do citrato em meio CR<sub>2</sub>aa suplementado com soro fetal bovino (SFB) ou livre de proteínas séricas e sua associação com taurina no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro*. Embriões foram cultivados em CR<sub>2</sub>aa contendo 0, 0,5, 1,0 e 3,0mM citrato, suplementado com 10% SFB (experimento 1) ou com álcool polivinil (PVA; experimento 2). No terceiro experimento, embriões foram cultivados em meio com 0,5mM citrato, ou 7mM taurina, ou com a associação de ambos, suplementado com SFB. Os cultivos foram realizados com células do *cumulus* em ambiente a 38,8°C com 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico. Melhora no desenvolvimento embrionário foi observado no cultivo de embriões em CR<sub>2</sub>aa com 0,5 e 1,0mM citrato na ausência de SFB (P<0,05), 8,6% e 11,3% de blastocistos, respectivamente, porém com valores mais baixos (P<0,05) que embriões cultivados em CR<sub>2</sub>aa com SFB (31,9%). Associação de citrato com taurina em meio com SFB não influenciou (P>0,05) a produção de embriões ou o número de células. Citrato em meio CR<sub>2</sub>aa pode ser uma alternativa para cultivo embrionário em condições atmosféricas com 5% de CO<sub>2</sub> em ar na ausência de proteína sérica.

Palavras-chave: bovino, embrião, citrato, taurina

### ABSTRACT

The effect of citrate added to CR<sub>2</sub>aa medium supplemented with fetal calf serum (FCS) or serum-protein-free and its association with taurine on the development of *in vitro*-fertilized bovine embryos was evaluated. Embryos were cultured with 0, 0.5, 1.0, and 3.0mM citrate, in CR<sub>2</sub>aa supplemented with 10% FCS (experiment 1), or polyvinyl alcohol (PVA; experiment 2). In experiment 3, embryos were cultured with 0.5mM citrate, 7.0mM taurine or with association of both, in medium supplemented with FCS. Embryo culture was performed with cumulus cells at 38.8°C in 5% CO<sub>2</sub> under air for all experiments. Positive effect on embryo development was only observed with 0.5 and 1.0mM citrate in FCS-free CR<sub>2</sub>aa (P<0.05; 8.6% and 11.3% blastocyst, respectively), however with lower embryo rate than CR<sub>2</sub>aa with FCS (31.9%). Association between citrate and taurine in medium supplemented with FCS did not affect (P>0.05) embryo rate nor total cell number. Citrate in CR<sub>2</sub>aa medium can be an alternative for serum-free embryo culture under 5% CO<sub>2</sub> in air, absence of serum protein.

Keywords: bovine, embryo, citrate, taurine

### INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma ferramenta de grande utilidade para o melhoramento genético em bovinos, podendo ser

utilizada em acasalamentos que contribuam para reduzir o efeito da consanguinidade em programas de seleção (Arendonk e Bijma, 2003). Sua utilização em animais impúberes também permite a redução do intervalo de gerações e,

associada ao uso de marcadores moleculares para a seleção assistida, pode contribuir mais intensamente para o ganho genético.

Vários laboratórios trabalham com a PIV, principalmente no Brasil, cuja produção corresponde a quase 50% do total de embriões PIV gerados em todo o mundo (Viana e Camargo, 2007). Contudo, somente 20 a 40% dos oócitos fecundados tornam-se embriões aptos a serem transferidos a receptoras (Merton et al., 2003). Diversos fatores podem contribuir para esse baixo resultado, entre eles a qualidade do oócito obtido da doadora (Merton et al., 2003), a fertilidade do sêmen (Camargo et al., 2002a) e a composição dos meios de cultivo *in vitro* (Thompson e Peterson, 2000).

Diversos componentes têm sido avaliados no cultivo *in vitro* de embriões bovinos fecundados *in vitro*, entre eles o citrato. Esse ingrediente possui papel no metabolismo energético, sendo utilizado no ciclo do ácido tricarboxílico para formação de energia. Participa no controle do metabolismo da glicose, inibindo a fosfofrutoquinase (Lodish et al., 2000) e estimulando a acetil CoA carboxilase, importante na síntese de ácido graxo (Berg et al., 2002). O uso do citrato no desenvolvimento embrionário tem sido avaliado em meio fluido sintético do oviduto (SOF), estimulando a produção de embriões (Holm et al., 1999), sendo atualmente incorporado à sua composição. O meio SOF suplementado com citrato é amplamente utilizado em ambiente atmosférico com 5% de O<sub>2</sub> (Holm et al., 1999; Sung et al., 2004), contudo, em ambiente com maior concentração de oxigênio (ar atmosférico; 20% de O<sub>2</sub>) e na ausência de células somáticas, pode resultar em baixo desenvolvimento embrionário (Rizos et al., 2001). O uso do citrato em outras condições de cultivo não tem sido avaliado.

O meio CR<sub>2</sub>aa foi desenvolvido para o cultivo de embriões e é quimicamente simples e adicionado de aminoácidos (Wilkinson et al., 1996). Sua utilização na ausência de soro fetal bovino (SFB) em ambiente atmosférico com 20% de O<sub>2</sub> (ar atmosférico) e 5% de CO<sub>2</sub> não tem resultado em melhora na produção ou na qualidade de embriões (Camargo et al., 2002b). Citrato adicionado ao meio CR<sub>2</sub>aa pode contribuir para o melhor desempenho de embriões bovinos cultivados na presença ou na ausência de SFB

em cocultura em ambiente atmosférico com 20% de O<sub>2</sub>, seja pela ação metabólica ou como antioxidante (Bavister, 1995).

A associação do citrato com outros agentes pode também ter efeito sinérgico sobre o desenvolvimento embrionário. A taurina é um aminoácido com ação antioxidante, que pode reduzir os efeitos prejudiciais da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante o cultivo *in vitro* (Liu e Foote, 1995). A utilização de substâncias antioxidantes no cultivo parece ser desejável, principalmente em ambiente com 20% de O<sub>2</sub>, em que ocorre maior formação de radicais livres (Bavister, 1995).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do citrato em meio CR<sub>2</sub>aa com ou sem soro fetal bovino e da sua associação com taurina no desenvolvimento pré-implantação de embriões bovinos fecundados *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Complexos células do *cumulus*-oócitos (COC) foram obtidos de ovários coletados em matadouro e transportados em solução fisiológica aquecida a 35°C. No laboratório, os COC foram aspirados de folículos de 2 a 8mm de diâmetro, com auxílio de uma seringa e agulha 21G. O líquido folicular foi recuperado em meio TALP - Hepes (Bavister et al., 1983) aquecido a 38°C, no qual os COC foram lavados. Com auxílio de um microscópio estereoscópio, foram selecionados para a maturação *in vitro* os que apresentavam células do *cumulus* compactas e com no mínimo três camadas. A maturação foi realizada em 400µL de Tissue Culture Medium 199<sup>1</sup> adicionado de 20µg/mL de FSH<sup>2</sup> e 10% de soro de vaca em cio, em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de umidade e temperatura de 38,8°C, por 22 a 24 horas. Após a maturação, os COC foram transferidos para o meio de fecundação.

Para a fecundação *in vitro* foi utilizado sêmen de touro Holandês, descongelado em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Os espermatozoides móveis foram selecionados pelo método de "swim up" em estufa incubadora a 38,8°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico. A fecundação foi realizada em microgotas de 100 a 200µL de

<sup>1</sup>Gibco - Grand Island, EUA.

<sup>2</sup>Pluset; Laboratórios Calier - Osasco, Brasil.

FERT-Talp (Gordon, 1994) com 10µg/mL de heparina<sup>3</sup>, em óleo mineral, na concentração espermática de 2,0-2,5x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, permanecendo por 20-22h, em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de umidade e 38,8°C.

Ao final desse período, presumíveis zigotos foram cocultivados com suas células do *cumulus* em meio CR<sub>2</sub>aa (Wilkinson et al., 1996) durante oito dias, em 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de umidade e 38,8°C em ar. Doze a 18 presumíveis zigotos foram cultivados em gotas de 50µL em óleo mineral. O meio foi renovado com 72h pós-fecundação.

A taxa de clivagem foi avaliada 72h pós-fecundação, e a de blastocisto entre o sétimo e oitavo dia. Embriões em estágio de blastocistos no oitavo dia pós-fecundação, classificados de acordo com Manual da International Embryo Transfer Society, foram fixados e corados com Giemsa para contagem do número de células, pelo procedimento descrito por Lim et al. (1994).

O experimento 1 avaliou o efeito de concentrações de citrato (citrato trissódico)<sup>3</sup> em meio de cultivo embrionário suplementado com SFB<sup>4</sup>. Oócitos fecundados *in vitro* (n=690) foram distribuídos em quatro tratamentos com 0, 0,5, 1,0 ou 3,0mM de citrato em meio CR<sub>2</sub>aa suplementado com 10% de SFB. Foram realizadas cinco repetições.

O experimento 2 avaliou as mesmas concentrações de citrato do experimento 1, porém em meio de cultivo embrionário livre de SFB. Oócitos fecundados *in vitro* (n=493) foram distribuídos aleatoriamente em cinco tratamentos. Quatro avaliaram as concentrações de 0, 0,5, 1,0 ou 3,0mM de citrato em meio CR<sub>2</sub>aa suplementado com 3mg/mL de álcool polivinil (PVA)<sup>4</sup> e livre de SFB. No quinto, os oócitos fecundados *in vitro* foram cultivados em CR<sub>2</sub>aa com 10% de SFB e sem citrato, formando o grupo-controle na presença de soro. Foram realizadas quatro repetições.

O experimento 3 avaliou o efeito da associação de citrato com taurina<sup>4</sup> em meio de cultivo embrionário suplementado com SFB. Oócitos fecundados *in vitro* (n=644) foram distribuídos

aleatoriamente em quatro tratamentos, sendo o primeiro com meio CR<sub>2</sub>aa suplementado com 10% de SFB (controle); o segundo com CR<sub>2</sub>aa suplementado com 10% de SFB, porém adicionado de citrato (0,5mM); o terceiro com CR<sub>2</sub>aa suplementado com 10% de SFB e taurina (7mM); e o quarto com CR<sub>2</sub>aa suplementado com 10% de SFB e citrato (0,5mM) com taurina (7mM). Foram realizadas cinco repetições.

A concentração de citrato no experimento 3 foi a determinada no experimento 1, sendo aquela com taxa de blastocistos mais elevada, e a de taurina identificada previamente por trabalho anterior avaliada em meio KSOM (Liu e Foote, 1995).

Os resultados de taxas de clivagem e de blastocistos foram submetidos ao teste do qui-quadrado, considerando-se nível de significância de P<0,05. Para o número total de células por blastocistos, fez-se análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de citrato em meio CR<sub>2</sub>aa suplementado com SFB (experimento 1) não aumentou (P>0,05) a produção de blastocistos e o número total de células (Tab. 1). Contudo, em CR<sub>2</sub>aa livre de proteínas séricas (com PVA; experimento 2), as concentrações de 0,5 e 1,0mM de citrato melhoraram (P<0,05) o desenvolvimento embrionário quando comparado com concentrações menores e maiores, que não produziram embriões (Tab. 2), embora a taxa de blastocistos tenha sido menor que a do controle com SFB. Ainda, no experimento 2, observou-se que a concentração de 3,0mM de citrato aumentou (P<0,05) a taxa de clivagem em relação à concentração de 0 e 0,5mM, porém não resultou em produção de blastocistos, sugerindo efeito negativo dessa concentração após as primeiras divisões celulares. O número total de células do tratamento com 0,5mM não foi diferente do número do tratamento com SFB, indicando qualidade embrionária mais próxima ao cultivo suplementado com soro.

<sup>3</sup>Sigma - St Louis, EUA.

<sup>4</sup>Nutricell - Campinas, Brasil.

*Efeito do citrato e taurina...*

Tabela 1. Taxas de clivagem e de blastocistos e número total de células de acordo com a concentração de citrato em meio de cultivo *in vitro*, suplementado com soro fetal bovino, no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro*

Citrato (mM)	N	Clivagem N (%)	Blastocistos N (%)	Total de células Média±EPM (N)
0	177	105 (59,3)	49 (27,7)	105,65±8,3 (41)
0,5	172	99 (57,6)	50 (29,1)	120,9±7,8 (42)
1,0	172	112 (65,1)	46 (26,7)	110,9±8,8 (41)
3,0	169	98 (58,0)	40 (23,7)	101,7±8,1 (36)

Não houve diferença entre tratamentos (P>0,05). EPM: erro-padrão da média.

Tabela 2. Taxas de clivagem e de blastocistos e número total de células de acordo com a concentração de citrato em meio de cultivo *in vitro* com álcool polivinil, livre de proteínas séricas, no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro*

Citrato (mM)	N	Clivagem N (%)	Blastocistos N (%)	Total de células (média±EPM) (N)
0	94	14 (14,9)a	0a	0
0,5	104	64 (61,5)b	9 (8,7)b	77,7±14,4ab (6)
1,0	80	52 (65,0)bc	9 (11,3)b	65,9±6,7b (7)
3,0	99	76 (76,8)c	0a	0
Controle (SFB)	116	83 (71,6)bc	37 (31,9)c	103,2±8,4a (19)

Valores com diferentes letras na mesma coluna diferem entre si (P<0,05). EPM: erro-padrão das médias.

Efeitos positivos do citrato em meio SOF livre de SFB têm sido relatados, porém em ambientes atmosféricos com tensão de 5% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> (Holm et al., 1999; Sung et al., 2004). Cultivo de embriões bovinos em ar atmosférico (20% de O<sub>2</sub>) e 5% de CO<sub>2</sub> geralmente utilizam SFB que, além de outras propriedades, pode atuar como agente antioxidante (Bavister, 1995), minimizando o efeito de uma alta tensão de O<sub>2</sub>. O presente resultado mostra que concentrações de 0,5 ou 1,0mM de citrato podem contribuir para o desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro* cultivados em outros meios livres de SFB além do SOF, como o CR<sub>2</sub>aa em condições atmosféricas com 5% de CO<sub>2</sub>.

A produção de blastocistos com citrato em CR<sub>2</sub>aa livre de proteína sérica está próxima à relatada em alguns trabalhos com SOF livre de proteínas (Wrenzycki et al., 2001, 15,9%; Orsi e Leese, 2004, 18,3%), porém é menor que a observada em outros estudos (Keskintepe et al., 1995, 34,9%; Holm et al., 1999, 42,0%). O número total de células observado nos embriões produzidos em CR<sub>2</sub>aa com PVA e citrato (77,7±14,4 e 65,9±6,7 para 0,5 e 1,0mM citrato, respectivamente) também foi similar ao de outros estudos com SOF e PVA (Kuran et al., 2001, 76,5±5; Orsi e Leese, 2004, 89,8±4). Uma diferença é o ambiente atmosférico de 5% de

CO<sub>2</sub> com 5% de O<sub>2</sub> nesses estudos e 5% de CO<sub>2</sub> em ar com 20% de O<sub>2</sub>, no presente trabalho. Essa pode ser uma das razões pela qual o grupo sem citrato em CR<sub>2</sub>aa com PVA tenha falhado em produzir embriões neste estudo.

Em ambientes com ar atmosférico, o citrato pode exercer efeito antioxidante indireto, substituindo um dos papéis do SFB. O citrato inibe a enzima fosfofrutoquinase (Lodish et al., 2000), promovendo o acúmulo de glicose-6-fosfato, que pode ser utilizado no ciclo da pentose, formando NADPH, importante na manutenção do potencial redutor da glutatone (Berg et al., 2002). O citrato pode atuar como quelante de metais pesados (Keskintepe et al., 1995), como o Fe utilizado na formação de radicais hidroxilas e outros agentes oxidantes (Papanikolaou e Pantopoulos, 2005), contribuindo para a redução na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Um efeito benéfico do citrato também pode ser pela presença de células somáticas no cultivo, como realizado no presente trabalho. Sung et al. (2004) observaram efeito positivo no desenvolvimento embrionário quando utilizaram citrato durante cocultura, sugerindo que este pode atuar removendo potenciais metabólitos tóxicos secretados por células somáticas. Células do *cumulus* têm papel antioxidativo no cultivo de oócitos suínos (Tatemoto et al., 2000) e na

fertilização em bovinos (Fatehi et al., 2005). Essas mesmas células podem exercer papel semelhante no cultivo embrionário, ao atuarem sinergicamente ao citrato, protegendo os embriões contra radicais livres presentes no sistema de cultivo.

Apesar do efeito positivo do citrato em meio sem adição de proteína sérica (experimento 2), as taxas de embriões produzidas estão aquém do sistema de cultivo com SFB, que é amplamente utilizado em sistemas comerciais de produção de embriões, sugerindo que outros componentes do soro necessitem ser repostos nessas condições de cultivo. Contudo este resultado mostra que o meio CR<sub>2</sub>aa adicionado de citrato pode ser uma alternativa para o cultivo livre de proteína sérica em experimentos que desejem avaliar efeitos de

substâncias em condições atmosféricas com 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

Experimentos anteriores verificaram efeito estimulador da taurina e seu precursor hipotaurina no desenvolvimento embrionário (Liu e Foote, 1995; Fujitani et al., 1997). Liu e Foote (1995) relataram efeito positivo de 7mM de taurina no desenvolvimento até blastocistos quando os embriões foram cultivados em ambiente atmosférico com 5% de CO<sub>2</sub> em ar. O experimento 3 avaliou a associação do citrato (0,5mM) com taurina (7mM), em meio CR<sub>2</sub>aa com SFB, no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro*. Neste experimento, não se observou (P>0,05) efeito da suplementação com citrato e taurina em meio de cultivo com SFB sobre a taxa de produção de embriões e o número de células (Tab. 3).

Tabela 3. Taxas de clivagem e de blastocistos e número total de células de acordo com os suplementos (taurina ou citrato) e sua associação em meio de cultivo com soro fetal bovino, no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro*

Suplemento (mM)	N	Clivagem N (%)	Blastocisto N (%)	Total de células (Mean±EPM) (N)
Controle <sup>1</sup>	166	106 (63,8)	29 (17,5)	108,5±7,5 (21)
Taurina (7,0)	164	117 (71,3)	36 (22,0)	102,5±6,9 (25)
Citrato (0,5)	155	110 (71,0)	35 (22,6)	99,1±5,8 (29)
Taurina (7,0) e citrato (0,5)	159	116 (73,0)	41 (25,8)	111,1±6,2 (32)

Não houve diferença entre tratamentos. P>0,05. EPM: erro-padrão da média.

<sup>1</sup>Controle: sem taurina e citrato

Taurina está presente no fluido tubárico (Guerin et al., 2001) e apresenta ação antioxidante em meios de cultivo embrionários com 20% de O<sub>2</sub> (Liu e Foote, 1995). Sua ação parece ser indireta, contribuindo para limitar os efeitos deletérios de ROS, neutralizando aldeídos citotóxicos (Guerin et al., 2001). Esse aminoácido possui também atividade osmorregulatória (Schaffer et al., 2000), podendo ser utilizado pelo embrião para regular seu volume diante de alterações osmóticas no ambiente (Dumoulin et al., 1997). A hipótese era de que a associação de taurina e citrato no cultivo *in vitro* promovesse melhor desenvolvimento embrionário. Contudo, esse efeito não foi confirmado. Este resultado mostra que a associação de ambos no cultivo *in vitro* em CR<sub>2</sub>aa suplementado com SFB não traz efeitos significativos ao desenvolvimento embrionário, talvez pela ação do soro e da cocultura nos

embriões, reduzindo ou mascarando o papel do citrato em conjunto com a taurina em meio CR<sub>2</sub>aa.

## CONCLUSÕES

O cultivo com citrato nas concentrações de 0,5 e 1,0 mM em meio CR<sub>2</sub>aa não apresenta vantagens quando comparado com cultivo utilizando SFB, contudo pode ser uma alternativa para experimentos que desejem avaliar efeitos de novas substâncias no desenvolvimento embrionário em condições atmosféricas com 5% de CO<sub>2</sub> em ar na ausência de proteína sérica.

## AGRADECIMENTOS

À Embrapa e ao CNPq pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARENDRONK, J.A.M.; BIJMA, P. Factors affecting commercial application of embryo technologies in dairy cattle in Europe—a modeling approach. *Theriogenology*, v.59, p.635-649, 2003.
- BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reprod. Update*, v.1, p.91-148, 1995.
- BAVISTER, B.D.; LEIBFRIED, M.L.; LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos on the Golden hamster in a defined culture medium. *Biol. Reprod.*, v.28, p.235-243, 1983.
- BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. *Biochemistry*. 5.ed. New York: W.H. Freeman & Co, 2002. 1100p.
- CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M. et al. Efeito de concentração espermática e período de incubação oócito-espermatozoide na fecundação *in vitro* em bovinos da raça Gir. *Pesq. Agrop. Bras.*, v.37, p.709-715, 2002a.
- CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M. et al. Taurina no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.54, p.396-404, 2002b.
- DUMOULIN, J.C.; VAN WISSEN, L.C.; MENHEERE, P.P. et al. Taurine acts as an osmolyte in human and mouse oocytes and embryos. *Biol. Reprod.*, v.56, p.739-744, 1997.
- FATEHI, A.N.; ROELEN, B.A.; COLENBRANDER, B. et al. Presence of cumulus cells during *in vitro* fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. *Zygote*, v.13, p.177-185, 2005.
- FUJITANI, Y.; KASAI, K.; OHTANI, S. et al. Effect of oxygen concentration and free radicals on *in vitro* development of *in vitro*-produced bovine embryos. *J. Anim. Sci.*, v.75, p.483-489, 1997.
- GORDON, I. *Laboratory production of cattle embryos*. CAB International. London: Cambridge University, 1994. 640p.
- GUERIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reprod. Update*, v.7, p.175-189, 2001.
- HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHMIDT, M.H. 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, p.683-700, 1999.
- KESKINTEPE, L.; BURNLEY, C.A.; BRACKETT, B.G. Production of viable bovine blastocysts in defined *in vitro* conditions. *Biol. Reprod.*, v.52, p.1410-1417, 1995.
- KURAN, M.; ROBINSON, J.J.; STAINES, M.E. et al. Development and protein synthetic activity of bovine embryos produced *in vitro* in different culture systems. *Theriogenology*, v.55, p.593-606, 2001.
- LIM, J.M.; OKITSU, O.; OKUDA, K. et al. Effects of fetal calf serum in culture medium on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, v.41, p.1091-1098, 1994.
- LIU, Z.; FOOTE, R.H. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O<sub>2</sub>. *Biol. Reprod.*, v.53, p.786-790, 1995.
- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L. et al. *Molecular Cell Biology*. 4.ed. New York: W.H. Freeman & Co, 2000. 1184p.
- MERTON, J.S.; DE ROOS, A.P.; MULLAART, E. et al. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, v.59, p.651-674, 2003.
- ORSI, N.M.; LEESE, H.J. Amino acid metabolism of preimplantation bovine embryos cultured with bovine serum albumin or polyvinyl alcohol. *Theriogenology*, v.61, p.561-572, 2004.
- PAPANIKOLAOU, G.; PANTOPOULOS, K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharm.*, v.202, p.199-211, 2005.
- RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M.P. et al. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology*, v.56, p.1-16, 2001.

- SCHAFFER, S.; TAKAHASHI, K.; AZUMA, J. Role of osmoregulation in the actions of taurine. *Amino Acids*, v.19, p.527-546, 2000.
- SUNG, L.Y.; DU, F.; XU, J. et al. The differential requirement of albumin and sodium citrate on the development of *in vitro* produced bovine embryos. *Reprod. Nutr. Dev.*, v.44, p.551-564, 2004.
- TATEMOTO, H.; SAKURAI, N.; MUTO, N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *In vitro* maturation: role of cumulus cells. *Biol. Reprod.*, v.63, p.805-810, 2000.
- THOMPSON, J.G.; PETERSON, A.J. Bovine embryo culture *in vitro*: new developments and post-transfer consequences. *Human Reprod.*, v.5, suppl., p.59-67, 2000.
- VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. *Acta Sci. Vet.*, v.35, suppl.3, p.s915-s919, 2007.
- WILKINSON, R.F.; MING, R.; ANDERSON, B. et al. The use of neural networks in developing novel embryo culture media-formulations. *Theriogenology*, v.45, p.41-49, 1996.
- WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L. et al. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation ovine embryos. *Human Reprod.*, v.16, p.893-901, 2001.