

Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos mantidos em fluido folicular bovino de folículos de diferentes diâmetros

Embryo development of bovine oocytes held in follicular fluid from bovine follicles of different diameters

Lucio Pereira RAUBER¹;
Denis Faustino ALVES¹;
Giuliano Moraes FIGUEIRÓ¹;
Daniela dos Santos BRUM¹;
Tiago Fernando HILGERT¹;
Mari Lourdes BERNARDI²;
Carlos Antônio Mondino SILVA¹;
Mara Iolanda Batistella RUBIN¹

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

Resumo

Oócitos bovinos têm sido mantidos em fluido folicular como meio para transporte e para aumento de sua competência, antes da maturação. Oitocentos e oitenta e um (881) oócitos foram aspirados de folículos de 2 a 8mm, de ovários de abatedouro, para avaliar o efeito da manutenção de oócitos bovinos em fluido folicular bovino de folículos de diferentes tamanhos sobre o desenvolvimento embrionário. Os oócitos foram distribuídos aleatoriamente em quatro tratamentos, com sete repetições cada. No grupo controle (n=217), os oócitos foram maturados por 24h em TCM-199 com Soro de Égua em Estro (SEE), piruvato e rFSH-h, em estufa a 39°C, com 5,00% de CO₂ e umidade saturada. No tratamento FFpequeno (n=216), os oócitos foram mantidos por 6h em fluido folicular de folículos de 3 a 5mm a 30°C e posteriormente maturados por 18h nas mesmas condições do grupo controle. Os oócitos dos tratamentos FFmédio (n=226) e FFgrande (n=222) foram mantidos em fluido folicular de folículos com 5,1 a 8mm e folículos maiores de 8,1mm, respectivamente e, após, maturados por 18h. Após a fecundação por 18h, os zigotos foram cultivados por 8 dias em SOFaaci com 5,00% de SEE, em estufa a 39°C, em bolsas gaseificadas com 5,00%CO₂, 5,00%O₂ e 90,00%N₂. Oócitos do grupo FFpequeno resultaram em menor (P<0,05) taxa de blastocistos em D7 que os grupos Controle e FFgrande. No D9, as taxas de blastocistos e de eclosão não diferiram (P>0,05) entre os grupos. O fluido folicular de folículos médios e grandes pode ser utilizado para o manutenção de oócitos bovinos por 6h a 30°C, antes da maturação por 18h.

Palavras-chave

Transporte.
Diâmetro folicular.
Maturação.
Meiose.

Correspondência para:

LUCIO PEREIRA RAUBER
EMBRYOLAB - Departamento de Clínica de Grandes Animais
Centro de Ciências Rurais
Universidade Federal de Santa Maria
97105-900 - Santa Maria - RS
e-mail: lrauber@bol.com.br

Recebido para publicação: 11/07/2002
Aprovado para publicação: 06/05/2003

Introdução

Em vacas cíclicas sadias, aproximadamente 85,00% dos oócitos ovulados se desenvolvem até embrião, enquanto que pela recuperação de oócitos com auxílio de ultra-sonografia (OPU) seguida da produção *in vitro* (PIV), 15,00 a 20,00% tornam-se embriões transferíveis¹. Um dos motivos desta baixa produção de embriões é a grande variação nas características dos oócitos recuperados, já que os folículos punccionados, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, estão em diferentes estágios de desenvolvimento e atresia. Com o crescente uso da OPU, na maioria dos casos, existe a necessidade de transportar os oócitos por um longo período de tempo até o laboratório onde é conduzida a produção dos embriões. Já se tem conhecimento de que oócitos bovinos podem ser mantidos em fluido folicular bovino ou equino, por até 6h, a 30°C, antes da maturação^{2,3}.

A competência do oócito refere-se à sua habilidade em se desenvolver até um determinado estágio embrionário, após a fecundação *in vitro*. A aquisição de competência para desenvolvimento depende de mudanças que ocorrem tanto no oócito quanto nas células que o envolvem diretamente e nas células do folículo⁴. Dentro do folículo, o oócito está em repouso na prófase da primeira divisão meiótica. Quando o oócito permanece no folículo, a maturação nuclear não ocorre até o surgimento da onda de LH⁵. A maturação em si inclui o complemento de dois programas celulares: maturação nuclear (retomada da meiose) e maturação citoplasmática (mudanças moleculares e estruturais). Estas mudanças conferem ao oócito maduro a capacidade de ser fecundado e desenvolver-se até estágios embrionários precoces⁶.

Richard e Sirard⁷ sugerem que fatores inibitórios são produzidos pelas

células da teca e/ou granulosa da parede folicular e que, em bovinos, as células da granulosa sozinhas são suficientemente competentes para a manutenção do oócito em meiose. Estes fatores estão presentes em maior concentração nos folículos menores, cujo fluido folicular é capaz de reter a meiose, durante a incubação *in vitro*⁸.

O fluido folicular (FF) bovino é um exsudato do plasma sanguíneo com diferentes fatores protéicos, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, esteróides e muitos outros metabólitos sintetizados pelas células da parede folicular⁹. Atualmente, o fluido folicular tem sido utilizado no meio de maturação em substituição a outras fontes protéicas. Romero-Arredondo e Seidel¹⁰ concluíram que a suplementação do meio de maturação com 20,00% de FF aumenta a qualidade dos oócitos, sendo que o fluido folicular pode ser utilizado em substituição ao soro fetal bovino^{11,12}. Já foi relatada a importância de alguns constituintes do fluido folicular na aquisição da competência de desenvolvimento do oócito. Os esteróides, como o estradiol e progesterona, estão altamente relacionados com o crescimento e atresia dos folículos, produzindo efeito também nos oócitos¹³.

No presente trabalho, avaliou-se a influência do diâmetro do folículo que fornece o fluido folicular para a manutenção de oócitos bovinos antes da maturação *in vitro*, sobre o futuro desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Material e Método

Obtenção do líquido folicular

Os folículos de ovários obtidos de frigoríficos foram dissecados totalmente com o auxílio de pinças e tesouras, sendo mensurados sob lupa estereomicroscópica, utilizando-se uma

régua milimétrica e paquímetro. Após medidos, os folículos foram separados em três grupos: os folículos recuperados com 3 até 5mm de diâmetro constituíram o grupo de fluido folicular de folículos pequenos (FFpequeno), os folículos com 5,1 a 8mm de diâmetro formaram o grupo de folículos médios (FFmédio) e, por último, os folículos com diâmetro 8,1 a 14 mm constituíram o grupo de folículos grandes (FFgrande).

Em seguida, os folículos foram secos com papel toalha e puncionados com bomba de vácuo (Nevoni Equipamento Odonto Méd. Hospitalar Ltda - Rua Dom João V, 266/280 Lapa 05075-060 São Paulo, SP). O líquido obtido de cada grupo de folículos foi centrifugado por 10 minutos a 1000g, o sobrenadante foi aliqotado em tubos Eppendorf (Eppendorf AG Barkhausenweg 1 22331 Hamburg, Alemanha) de fundo cônico com 400µL de fluido folicular e estocados a -20°C.

Coleta e seleção dos oócitos

Os oócitos utilizados no experimento foram obtidos de ovários provenientes de frigorífico e transportados a 30°C em solução fisiológica a 0,90% de NaCl. No laboratório, os ovários foram lavados em álcool 70% e, em seguida, lavados em solução fisiológica. Os folículos com diâmetro entre 2 e 8mm foram puncionados com auxílio de uma bomba de vácuo e os oócitos mantidos em fluido folicular para identificação sob lupa estereomicroscópica. Após este procedimento, foram selecionados os oócitos com camadas múltiplas de células do *cumulus* e ooplasma homogêneo¹⁴.

Maturação e fecundação *in vitro* dos oócitos

Efetuada a seleção, os CCO's foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de 20 a 30 oócitos. O grupo controle (C) foi lavado cinco vezes

com meio composto de TCM-199³ modificado, adicionado de 5,95mg/ml de HEPES (Sigma Chemical CO - P.O. Box 14508, St Louis, MO, 63178, USA), 0,025mg/ml de piruvato de sódio e 10,00% de soro de égua em estro^{15,16} sendo denominado de TCM-HEPES. Esse grupo foi passado diretamente ao meio de maturação *in vitro*, constituído pelo meio TCM-199 acrescido de 0,01UI de rFSHh/mL (Serono Pharma S.P. a - 70123 Bari, Italia. Cat. L1930300), distribuído em gotas de 400µL de meio, em placas de cultivo de quatro poços (Nunc A/S- Kamstrupvej 90 - P.º Box 280 DK-4000 Roskilde, Dinamarca. Cat.176740), permanecendo por 24h em estufa de cultivo (W.C. Heraeus GmbH & Co. KG - Heraustrasse 12-14 63450 Hanau, Alemanha) à temperatura de 39°C, com 5,00% de CO₂ em ar e umidade saturada. Os oócitos dos grupos FFpequeno, FFmédio e FFgrande foram depositados em 400µL do FF correspondente, em tubos de poliestireno (Fisher Scientific Company, Pittsburgh, PA 15621m USA. Cat. 14.956-3C) de 5mL. Os tubos foram vedados, envoltos por papel alumínio e mantidos em banho-maria por 6h a 30°C, sem controle da atmosfera gasosa. Após esse período, os oócitos recuperados foram lavados cinco vezes com o meio TCM-HEPES e colocados para maturar em meio idêntico ao utilizado na maturação do grupo controle, porém por um período de 18 horas.

Os oócitos foram transferidos do meio de maturação para gotas de 400µL de meio TALP-FERT, com 6mg/ml de BSA (Gibco™ Grand Island, NY, 14072, USA), 0,22mg/ml de piruvato de sódio e PHE. Este meio foi estabilizado em estufa por duas horas e, imediatamente após, adicionava-se ao mesmo 30mg/ml de heparina para então proceder à fecundação com sêmen congelado de um touro *Bos taurus* previamente testado para a FIV. Os

espermatozoides foram selecionados por migração ascendente (swim-up), em meio TALP-SPERM, acrescido de 6mg/mL de BSA e 0,11mg/mL de piruvato de sódio. Para a fecundação utilizou-se uma dose inseminante na concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL e a incubação dos oócitos/espermatozoides foi conduzida em estufa de cultivo a 39°C, com 5,00% de CO₂ em ar, com umidade saturada, por um período de 18 horas.

Cultivo *in vitro* dos embriões

Após o período de fecundação, os oócitos/zigotos foram retirados do meio FERT-TALP e submetidos à agitação mecânica, em vórtex, por 85 segundos, com o objetivo de liberar as células do *cumulus oophorus*. Encerrado este procedimento, os oócitos recém-fecundados foram transferidos para o meio de cultivo SOF modificado por Holm. Booth e Schmidt¹⁷, contendo 5,00% de SEE, onde permaneceram por 8 dias, em gotas de 400µL, em placas de cultivo de quatro poços sob óleo mineral dentro de bolsas gaseificadas com 5,00% de CO₂, 5,00% de O₂ e 90,00% de N₂, em estufa de cultivo a 39°C. A avaliação da taxa de clivagem foi efetuada no dia 2 (D2); de blastocistos (Blastocistos iniciais, Blastocistos, Blastocistos expandidos e eclodidos), no dia 7 (D7) e de blastocistos expandidos/eclodidos, no dia 9 (D9). Além disto, foi avaliada a taxa de eclosão, representada pelo número de blastocistos eclodidos sobre o número de blastocistos obtidos no D7. Considerou-se a data da fecundação como dia zero (D0). Após a avaliação da taxa de desenvolvimento no D9, os blastocistos eclodidos de todos os grupos foram fixados em paraformolaldeído a 2,00%, para a realização da contagem do número de células. Os embriões foram corados com Hoechst 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 (410 nm).

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi de blocos inteiramente casualizados. Os diferentes tratamentos foram realizados simultaneamente, sendo que cada uma das sete repetições foi considerada um bloco. Antes da análise, os dados referentes ao número de células dos blastocistos foram submetidos à transformação logarítmica de modo a uniformizar a variância. Os resultados foram processados pelo programa estatístico SAS utilizando o procedimento GLM¹⁸ e as médias comparadas pelo teste de Tukey com um nível de 5,00% de significância.

Resultados

Os resultados referentes às taxas de clivagem, blastocistos e taxa de eclosão estão apresentados na Tabela 1. Na avaliação realizada no D2, a taxa de clivagem do grupo controle não diferiu ($P > 0,05$) do grupo mantido em fluido folicular de folículos pequenos (FFpequeno), mas foi superior ($P < 0,05$) à observada nos grupos mantidos em fluido folicular de folículos médios (FFmédio) e grandes (FFgrande). Na avaliação do D7, os grupos controle e FFgrande apresentaram uma maior taxa de blastocistos ($P < 0,05$) que o grupo FFpequeno. No D9, não houve diferença significativa nas taxas de blastocistos e na taxa de eclosão ($P > 0,05$) entre os grupos. Embora a taxa de blastocistos observada no grupo de oócitos mantido em FFgrande (24,80%) tenha sido superior ao FFpequeno (13,90%), essa diferença não foi significativa.

Não houve diferença ($P > 0,05$)

Tabela 1

Produção de embriões bovinos com oócitos mantidos por 6 horas a 30°C em fluido folicular de folículos de diferentes diâmetros. Embryolab-UFSM/Santa Maria, RS. Julho de 2002

Grupos	CCOs Cultivados (n)	Clivagem (%)	Blastocistos D7 (%)	Blastocistos D9 (%)	Taxa de Eclosão/D7 (%)
Controle	217	94,5 ± 0,89 ^a	30,4 ± 2,98 ^a	18,9 ± 2,58 ^a	25/66 (37,9 ^a)
Ffpequeno	216	85,6 ± 3,22 ^{ab}	19,0 ± 2,38 ^b	13,9 ± 1,92 ^a	17/41 (41,5 ^a)
Ffmédio	226	83,6 ± 3,62 ^b	23,5 ± 3,31 ^{ab}	20,4 ± 4,54 ^a	31/53 (58,5 ^a)
Ffgrande	222	82,9 ± 4,26 ^b	29,3 ± 2,30 ^a	24,8 ± 3,46 ^a	29/65 (44,6 ^a)

^{a,b} médias seguidas de letras diferentes, nas colunas, diferem significativamente (P < 0,05)

Maturação por 24h (controle); maturação por 18h após manutenção por 6h a 30°C em fluido folicular de folículos de 3 a 5mm (Ffpequeno), 5,1 a 8mm (Ffmédio) ou 8,1 a 14 mm (Ffgrande)

Tabela 2

Número médio de células de blastocistos eclodidos obtidos após a fecundação *in vitro* de oócitos bovinos mantidos por 6 horas em fluido folicular de folículos de diferentes diâmetros. Embryolab-UFSM-Santa Maria, RS. Julho de 2002.

Grupos	Nº de Embriões	Número de células ± Desvio-Padrão
Controle	11	129,54 ^a ± 8,12
FFpequeno	8	163,75 ^a ± 22,97
FFmédio	13	161,84 ^a ± 14,97
FFfgrande	14	175,00 ^a ± 12,39

^{a,b} médias seguidas de letras diferentes, nas colunas, diferem significativamente (P < 0,05)

Maturação por 24h (controle); maturação por 18h após manutenção por 6h a 30°C em fluido folicular de folículos de 3 a 5mm (Ffpequeno), 5,1 a 8mm (Ffmédio) ou 8,1 a 14 mm (Ffgrande)

no número médio de células de blastocistos eclodidos, entre os tratamentos (Tabela 2), embora os embriões do grupo controle tenham apresentado número de células inferior aos blastocistos do grupo FFgrande.

Discussão

Outros autores^{2,3} utilizaram o fluido folicular obtido da punção de folículos bovinos entre 2 e 8mm de diâmetro para o transporte de oócitos, mas sabe-se que neste *pool* existem folículos em estágios diferenciados de desenvolvimento e atresia, cujo fluido apresenta composição variável^{12,19,20,21}. Levando em conta este aspecto, no presente estudo foi avaliado se o tamanho folicular poderia influenciar na capacidade de maturação ou desenvolvimento pós-fecundação de oócitos bovinos. Evidenciou-se que a manutenção dos oócitos em fluido de

folículos de 3 a 5mm resultou em menor produção de blastocistos em D7, em comparação ao grupo controle e aos oócitos que foram expostos ao fluido de folículos com diâmetro superior a 8mm.

Oócitos bovinos obtidos de folículos menores de 2mm de diâmetro dificilmente desenvolvem-se além de 8 células. Já os oócitos provenientes de folículos de tamanho médio a grande possuem capacidade de desenvolvimento semelhante²². Visto que o aumento da competência de desenvolvimento do oócito bovino é associado com o aumento do diâmetro do folículo^{1,4}, a manutenção dos oócitos em fluido folicular, antes da maturação, tem como objetivo, além do transporte, simular a permanência dos oócitos em um folículo de tamanho compatível com a presença de fatores que possam ser favoráveis para sua competência. Embora o crescimento do oócito esteja quase completo quando seu folículo atinge 3mm de diâmetro, o

crescimento folicular está associado ao aumento dos níveis intrafoliculares de estradiol e à diminuição das proteínas de ligação do IGF^{23,24}, condições essenciais para que os folículos estabeleçam sua dominância. Além disto, a secreção pré-ovulatória de gonadotrofinas suprime os fatores inibidores da meiose produzidos pelas células da granulosa²⁵. Desta forma, é possível que o fluido folicular proveniente de folículos maiores de 8mm tenha uma menor concentração de fatores inibidores, e uma maior concentração de fatores estimuladores da maturação oocitária, já que correspondem a folículos que foram selecionados e iriam exercer dominância sobre os outros.

O desenvolvimento embrionário, após a maturação e fecundação *in vitro*, é menos efetivo do que o de oócitos maturados *in vivo*. Acredita-se que isto ocorra por uma maturação citoplasmática incompleta²⁶. De acordo com Hendriksen et al.¹, a quebra da vesícula germinativa (VG) *in vitro* ocorre mais rapidamente (5 a 6 h) do que *in vivo* (7 a 10 h), sugerindo que antes de continuar a maturação é requerido um período de pré-maturação, que ocorre naturalmente *in vivo* durante o desenvolvimento pré-ovulatório. Embora tenha sido demonstrado que o fluido folicular de folículos pequenos (<3mm) favorece a manutenção do estado de VG⁸, a presença de 80,00% de fluido de folículos de tamanho médio (3 a 5mm) não é eficaz na retenção da meiose^{27,28}. Além disto, o fluido de folículos ≥ 6 mm foi incapaz de reter a meiose dos oócitos, os quais apresentaram, nas 12, 18 e 24h de incubação, percentuais de VG semelhantes aos expostos a soro fetal bovino²⁸. Estas observações, associadas às do presente estudo, no qual folículos de tamanho médio (5,1-8mm) e grande ($\geq 8,1$ mm) conferiram um maior potencial de desenvolvimento após fecundação do que folículos pequenos (3-

5mm), evidenciam que não é somente um maior tempo de retenção da meiose que irá permitir a maturação citoplasmática, mas esta parece depender também da composição do meio em que os oócitos se encontram.

É provável que substâncias estimuladoras estejam presentes nos folículos grandes e médios e ausentes ou presentes em menor concentração nos folículos pequenos. Esta hipótese é reforçada pelas observações de que a presença de fluido folicular bovino de folículos ≥ 15 mm, no meio de maturação²⁹, e de folículos de 1 a 5mm, no meio de fecundação³⁰, apresentaram um efeito positivo e negativo, respectivamente, sobre o desenvolvimento embrionário em bovinos. Oócitos bovinos obtidos de folículos antrais cultivados por 24h tiveram desenvolvimento significativamente maior do que os aspirados diretamente de folículos de 3 a 8mm de diâmetro³¹. De fato, os oócitos removidos de folículos de 2 a 8mm são expostos a condições de maturação *in vitro* que não imitam a modificação gradual da composição do fluido folicular que ocorre *in vivo*, aspecto importante sobretudo para oócitos obtidos dos folículos menores, cuja composição do fluido ainda não passou por mudanças substanciais. Isto sugere que um maior período de permanência junto ao folículo faz com que o oócito adquira uma maior capacidade de desenvolvimento, o que pode ser simulado, *in vitro*, pelo menos parcialmente, pela sua exposição ao fluido folicular de folículos cuja composição esteja mais próxima daquela presente *in vivo*, no período pré-ovulatório.

Observou-se, no presente estudo, que os embriões dos tratamentos em que os oócitos foram expostos ao fluido folicular apresentavam uma qualidade morfológica superior aos do grupo controle. O menor número ($P < 0,08$) de células observadas nos embriões obtidos

dos oócitos do grupo controle em comparação aos oócitos mantidos em FFgrande, confirmaria esta observação. No entanto, como isto não foi efetuado de forma sistemática, em todas as repetições do experimento, de modo a permitir uma análise mais detalhada, sugere-se que em novos estudos este aspecto seja considerado.

A constatação de que o fluido folicular de folículos médios e grandes apresenta bons resultados de PIV reforça a idéia de que o mesmo seja um meio efetivo para o transporte de oócitos obtidos por OPU, por um período de até 6 horas. A vantagem da utilização de fluido folicular de folículos deste tamanho

é que os mesmos podem facilmente ser visualizados na superfície do ovário, podendo ser aspirados diretamente, sem a necessidade de dissecação, como foi efetuado no presente estudo.

Conclusões

A manutenção de oócitos bovinos, por um período de 6h, a 30°C, antes da maturação *in vitro* por 18h, pode ser efetuada em fluido folicular bovino de folículos grandes ($\geq 8,1$ mm) e médios (5,1-8mm) visando sua aplicação nos programas de PIV.

Summary

Bovine oocytes have been maintained in the follicular fluid to be transported and to increase their competence, before maturation. Eight hundred eighty-one (881) oocytes, aspirated from bovine slaughterhouse ovaries, were used to evaluate the effect of holding bovine oocytes in follicular fluid (FF) of bovine follicles of different diameters on the rate of embryo development. The oocytes were randomly distributed in four treatments with seven replicates each: The control group (n=217) was constituted by oocytes matured for 24h in modified TCM-199 with Estrus Mare Serum (EMS), pyruvate and rFSH-h in incubator with 5,00% CO₂, 39°C and saturated humidity. In the FFsmall group (3 to 5mm follicles; n=216), the oocytes were held for 6h in follicular fluid at 30°C and matured for 18h in the same conditions of the Control-group. The oocytes of the FFmedium group (5,1-8mm follicles; n=226) and of the FFlarge group ($\geq 8,1$ mm follicles; n=222) were held in follicular fluid and matured like FFsmall. Fertilization was accomplished during 18h and, after this, the zygotes were cultured for 8 days in SOFaaci medium + 5,00% EMS in incubator at 39°C using plastic bags gasified with 5,00%CO₂, 5,00%O₂ and 90,00%N₂. FFsmall oocytes produced a lower (P<0,05) blastocyst rate than Control and FFlarge groups, at D7. At D9, blastocyst and hatching rates were similar (P>0,05) between the groups. Follicular fluid of medium and large follicles could be used to hold for 6h at 30°C bovine oocytes before their maturation for 18h.

Key-words

Transport.
Follicular diameter.
Maturation.
Meiosis.

Referências

- 1 - HENDRIKSEN, P. J. M. et al. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 11-20, 2000.
- 2 - LEHMKUHL, R. C. **Desenvolvimento de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular**. 2001. 16 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2001.
- 3 - PINTO, M. G. L. et al. Holding bovine oocytes on equine follicular fluid for PIV. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 736, 2002.
- 4 - BLONDIN, P. et al. *In vitro* production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, v. 47, n. 5, p. 1061-1075, 1997.
- 5 - SIRARD, M. A. Temporary inhibition of meiosis resumption *in vitro* by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 33, n. 4, p. 757-767, 1990.
- 6 - BEVERS, M. M. et al. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 13-22, 1997.
- 7 - RICHARD, F.; SIRARD, M. A. Effects of follicular cells on oocyte maturation II: theca cell inhibition of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 1, p. 22-28, 1996.
- 8 - EMANUELLI, I. P. et al. Líquido folicular na inibição da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 28, n. 1, p. 246, 2000.
- 9 - GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryo**. Cambridge: CAB International, University Press, 1994, 640p.
- 10 - ROMERO-ARREDONDO, A.; SEIDEL, G. E. Effects of bovine follicular fluid on maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 41, n. 2, p. 383-394, 1994.
- 11 - CHOI, Y. H. et al. Developmental capacity of bovine oocytes matured in two kinds of follicular fluid and fertilized *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 50, n. 1-2, p. 27-33, 1998.
- 12 - RODOVALHO, N. C. M. et al. Proteoma do líquido folicular bovino em função do tamanho folicular. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 28, n. 1, p. 322, 2000.
- 13 - HAZELEGER, N.L. et al. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, v. 43, n. 2, p. 509-522, 1995.
- 14 - De LOOS, F. et al. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, v. 24, n. 2, p. 197-204, 1989.
- 15 - FIGUEIRÓ, G. M. et al. Soro eqüino na PIV de embriões bovinos: I. uma análise do soro de égua em diferentes estágios do cio. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 28, n. 1, p. 258, 2000.
- 16 - FIGUEIRÓ, G. M. et al. Soro eqüino na PIV de embriões bovinos: II. uma análise da adição de FSH e LH. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 28, n. 1, p. 259, 2000.
- 17 - HOLM, P.; BOOTH, P. J.; SCHMIDT, M. H. 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. 4, p. 683-700, 1999.
- 18 - SAS INSTITUTE (Cary NC). **SAS user's guide: statistical analysis system**, Release 6.12-1998.
- 19 - DODE, M. A. N. et al. Composição química do líquido folicular bovino de acordo com tamanho de folículo. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 28, n. 1, p. 243, 2000.
- 20 - PORTELA, V. G. et al. Relação entre as concentrações de Na, K, Mg e Ca no fluido folicular e a qualidade de folículos ovarianos de vacas. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 28, n. 1, p. 316, 2000.
- 21 - BEG, M. A. et al. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 1 p. 120-126, 2002.
- 22 - JEWGENOW, K., HEERDEGEN, B., MÜLLER, K. *In vitro* development of individually matured bovine oocytes in relation to follicular atresia. **Theriogenology**, v. 51, n. 4, p. 745-756, 1999.
- 23 - AUSTIN, E. J. et al. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 3 p. 839-848, 2001.
- 24 - FORTUNE, J. E. et al. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 648-654, 2001.
- 25 - QUERO, J. M. O.; MILLÁN, M. M.; CÓRDOBA, M. V. The influence of different types of media supplement on the meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, v. 41, n. 2, p. 405-411, 1994.
- 26 - KIM, K. S. et al. The effects of follicular fluid on *in vitro* maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 45, n. 4, p. 787-799, 1996.
- 27 - ADONA, P. R. et al. O uso do líquido folicular para retenção da meiose em ovócitos bovinos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 28, n. 1, p. 193, 2000.
- 28 - DODE, M. A. N.; ADONA, P. R.; RODOVALHO, N. C. M. Retenção da meiose

- de ovócitos bovinos em líquido folicular de folículos de vários tamanhos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 28, n. 1, p. 241, 2000.
- 29 - ELMILEIK, A. M. A.; MAEDA, T.; TERADA, T. Higher rates of development into blastocyst following the *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured in a medium supplemented with the fluid from large bovine follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 38, n. 1-2, p. 85-96, 1995.
- 30 - CHOI, Y. H. et al. Effects of follicular fluid on fertilization and embryonic development of bovine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, v. 49, n. 6, p.1103-1112, 1998.
- 31 - FOULADI NASHTA, A. A.; WADDINGTON, D.; CAMPBELL, K. H. S. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development *in vitro*: a comparative evaluation of antral follicle culture with other methods. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 2 p. 255-262, 1998.