

Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação por diferentes períodos de tempo sem controle da atmosfera gasosa

[*Transport of bovine oocytes in maturation medium for different periods of time without controlled gaseous atmosphere*]

L.K.X. Silva¹, A.N. Reis¹, A.O.A. Silva², J.S. Sousa^{1,2}, A.J.O. Souza², W.G. Vale²

¹INVITRO-CEBRAN - UFPA – Castanhal, PA

²Central de Biotecnologia de Reprodução Animal - UFPA
68741-400 – Castanhal, PA

RESUMO

Avaliou-se a viabilidade do transporte de oócitos em meio quimicamente definido, e analisou-se a necessidade da adição ou não de hormônios neste meio. Os oócitos do grupo-controle (0h) foram maturados por 24h em estufa de CO₂, e os dos grupos experimentais foram transportados em incubadora portátil. No experimento I, as taxas de clivagem foram similares ($P>0,05$) para os grupos 0h (59,7%), 3h (53,5%) e 9h (48,8%), e houve redução nos grupos 6h (46,1%) e 12h (43,8%). Essas taxas foram semelhantes entre os grupos 3h, 6h, 9h e 12h. A produção de blastocistos não foi diferente ($P>0,05$) para os grupos 0h (38,0%), 3h (32,3%), 6h (27,3%) e 9h (24,8%), e houve redução no grupo 12h (18,9%). Essas taxas foram semelhantes entre os grupos 6h, 9h e 12h. No experimento II, não houve diferença ($P>0,05$) entre as taxas de clivagem para os grupos 0h (71,4%), 3h (70,3%), 6h (56,0%) com hormônios, e os grupos 3h (64,8%) e 6h (54,1%) sem hormônios. A produção de blastocistos foi similar ($P>0,05$) para os grupos 0h (46,1%), 3h com hormônios (45,8%) e 3h sem hormônios (41,1%), porém houve redução nos grupos 6h com hormônios (35,5%) e 6h sem hormônios (33,5%). Essas taxas foram semelhantes entre os grupos 3h sem hormônios e 6h com e sem hormônios. Estes resultados indicam que é possível o transporte de oócitos bovinos por um período de até nove horas, e que a adição de hormônios neste meio não influencia os índices de clivagem e de blastocistos.

Palavras-chave: bovino, oócitos, embrião, transporte

ABSTRACT

The viability of the transport of the bovine oocytes was evaluated in chemically defined medium and the need for the addition or not of hormones in this medium was analyzed. The oocytes in the control group (0h) were matured for 24h in CO₂ incubator, and in experimental groups they were transported in portable incubator. In experiment I, the cleavage rates were similar ($P>0.05$) to the groups 0h (59.7%), 3h (53.5%), and 9h (48.8%), but they decreased in groups 6h (46.1%) and 12h (43.8%), however, these rates were similar among the groups 3h, 6h, 9h, and 12h. The production of blastocysts was not different ($P>0.05$) for groups 0h (38.0%), 3h (32.3%), 6h (27.3%), and 9h (24.8%), but there was a reduction in the 12h group (18.9%). These rates were similar among the groups 6h, 9h and 12h. In experiment II, no significant difference ($P>0.05$) was observed among the rates of cleavage for the groups 0h (71.4%), 3h with (70.3%) and without hormones (64.8%), and 6h with (56.0%) and without hormones (54.1%). The production of blastocysts was similar ($P>0.05$) for groups 0h (46.1%) and 3h with (45.8%) and without hormones (41.1%), but decreased in groups 6h with (35.5%) and without hormones (33.5%). These rates were similar among the groups 3h without, 6h with and without hormones. These results indicate the possibility of the transport of bovine oocytes up to 9h, and the addition of hormones in this medium does not influence the rates of cleavage and blastocysts.

Keywords: bovine, oocytes, embryo, transport

Recebido em 3 de junho de 2009

Aceito em 10 de janeiro de 2011

E-mail: silva_lilian@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Entre as biotécnicas aplicadas ao melhoramento genético bovino que possibilitam aumentar o número de descendentes de um animal de alto valor genético, destaca-se a produção *in vitro* de embriões (PIVE). Para a PIVE bovinos, os oócitos podem ser obtidos de ovários de vacas abatidas em frigoríficos ou de animais vivos; neste último caso, pela ovariectomia e laparoscopia ou, ainda, por aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (OPU – *Ovum Pick-up*) (Tessmann, 2004).

O sucesso da OPU/PIVE depende de vários fatores, tais como: genética dos animais, raça, idade (Rocha et al., 1998), estação do ano (Al-Katanani et al., 2002), origem e qualidade dos oócitos (Rizos et al., 2002), condições de cultivo dos oócitos e experiência do técnico, assim como do número de oócitos obtidos por colheita (Watson et al., 2000; Lonergan et al., 2003).

Em alguns animais, é comum a recuperação de poucos ou de apenas um oócito por doadora, no entanto há necessidade de que estes sejam aproveitados. Dessa forma, estudos têm sido realizados para encontrar alternativas que preservem, ao máximo, a viabilidade do oócito durante o transporte até o laboratório de PIVE, uma vez que a qualidade intrínseca deste é um fator determinante no desenvolvimento embrionário inicial (Rizos et al., 2002; Dode et al., 2003). Deve-se levar em consideração que, no Brasil, em função da grande extensão territorial, principalmente da região Norte, as condições de transporte dos oócitos até o laboratório de PIVE são consideradas como fator limitante na produção comercial, pois, em muitos casos, o transporte pode demorar várias horas (Leivas et al., 2001).

As substâncias e os métodos de transporte utilizados entre os laboratórios vão desde criotubos a tubos de ensaio em estufas portáteis (Kaiser et al., 1999), em que o pH dos meios é controlado pelo sistema bicarbonato/CO₂ (Gordon, 1994). O transporte também pode ser feito em meios que contenham tampão orgânico (Hepes), que não necessita do controle da atmosfera, mas apenas de monitoramento da temperatura (Shi et al., 1998) e do tempo de transporte (Ward et al., 2000). Assim, têm sido utilizados tubos de poliestireno em banho-maria

(Olivier et al., 1998) ou placas de cultivo acondicionadas em bolsas plásticas seladas (Palma et al., 1998).

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a viabilidade do transporte simulado de oócitos bovinos em meio quimicamente definido associado ao tampão Hepes a 38,5°C, suplementado ou não com hormônios, por diferentes períodos de tempo, sem o controle da atmosfera gasosa, por meio de determinação das taxas de clivagem e de blastocisto.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ovários foram obtidos de fêmeas bovinas abatidas em frigoríficos localizados no município de Castanhal, PA. O processamento do material foi realizado no laboratório de fertilização *in vitro* da Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN/UFPa). Os ovários foram transportados em solução salina a 0,9%, em recipiente térmico, para a manutenção da temperatura entre 35-37°C. No laboratório, foram submetidos à aspiração, e o líquido folicular obtido foi colocado em tubo de centrífuga (Falcon) de 15mL para a sedimentação dos oócitos. Após sedimentação, colheita e seleção, os oócitos foram classificados segundo Gonsalves et al. (2008). Foram considerados viáveis os oócitos com *cumulus* compacto (COC), os quais foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos experimentais.

O estudo foi dividido em dois experimentos, e em cada experimento foi utilizado um grupo-controle (0h), em que os oócitos, não submetidos ao transporte simulado, foram selecionados, colocados no meio de MIV e levados à estufa de CO₂.

No experimento I, os oócitos foram divididos em cinco grupos – 0h, 3h, 6h, 9h e 12h –, e foram realizadas 10 repetições, num total de 649 oócitos. Nos grupos submetidos ao transporte simulado, os oócitos permaneceram por diferentes períodos de tempo – três, seis, nove e 12 horas – em criotubos de 1,5mL contendo o meio de transporte-maturação composto de TCM, acrescido de bicarbonato, Hepes, SFB, piruvato, gentamicina e hormônios acondicionados em incubadora portátil (Minitub), destinada ao transporte de oócitos e embriões. Essa incubadora possui em seu interior

esferas metálicas, que possibilitam a manutenção rigorosa da temperatura, facilitam o posicionamento das células transportadas e proporcionam um ambiente absolutamente seco e higiênico, sem o controle da atmosfera gasosa.

No experimento II, os oócitos foram divididos em cinco grupos – 0h, 3h com hormônios, 3h sem hormônios, 6h com hormônios e 6h sem hormônios –, e foram realizadas cinco repetições, num total de 340 oócitos. Nos grupos submetidos ao transporte simulado, os oócitos permaneceram por diferentes períodos de tempo – três e seis horas – em criotubos de 1,5mL contendo o meio de transporte-maturação composto de TCM, acrescido de bicarbonato, Hepes, SFB, piruvato, gentamicina, adicionado ou não de hormônios acondicionados em incubadora portátil.

Decorridos os respectivos períodos de transporte, os oócitos foram transferidos para placas contendo meio de MIV e levados à estufa de CO₂, onde permaneceram o tempo necessário para completar as 24h de maturação.

A MIV foi realizada em meio TCM acrescido de bicarbonato, Hepes, SFB, piruvato, gentamicina e hormônios, em estufa com 5% de CO₂ em ar, 38,5°C e alta umidade, por 24h.

O sêmen destinado à fertilização *in vitro* (FIV) estava envasado em minitubo e foi preparado em gradiente de Percoll de 45 e 90%. A FIV foi realizada em meio Talp-Stock acrescido de BSA, piruvato, gentamicina, PHE e heparina, em estufa, nas mesmas condições da MIV, por um período de 18-22h.

Após a FIV, os supostos embriões foram transferidos para gotas de cultivo de 50µL de meio SOF. A taxa de clivagem foi analisada 72h (terceiro dia) após o início do CIV, quando foi realizada a primeira suplementação alimentar, ou seja, acréscimo de 50µL de meio SOF recém-preparado (primeiro *feeding*) nas gotas de cultivo. O segundo *feeding* foi feito no quinto dia, quando foram retirados 50µL do meio já metabolizado pelos embriões e acrescentado mais 50µL do meio recém-preparado, e no sétimo dia foi observada a taxa de blastocistos.

Para análise dos dados, foi utilizado o *software* BioEstat 2.0 estatística descritiva e foi

empregado o teste Kruskal-Wallis, para determinação, no experimento I, da diferença das taxas de clivagem e de blastocistos em relação ao tempo, e no experimento II, da interação tempo *versus* presença ou não de hormônios, estabelecendo-se 5% como nível de confiança (P<0,05). Para verificar a diferença entre os tratamentos, foi usado o teste Dunn, também com nível de confiança de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que o transporte de oócitos em incubadora portátil, semelhante à utilizada, tem como vantagem a manutenção da temperatura de transporte constante (38,5°C), fato que, segundo Boone e Shapiro (1990), contribui para a obtenção de alta taxa de desenvolvimento embrionário. A temperatura utilizada no transporte-simulado foi próxima à temperatura fisiológica da espécie, possibilitando a obtenção de resultados satisfatórios, com média de taxas de clivagem e blastocistos de 56,8% e 34,2%, respectivamente. Entretanto, Schwartz et al. (1998) afirmaram que melhores taxas de clivagem e blastocistos podem ser obtidas mantendo-se os oócitos antes da MIV a 20°C do que a 39°C em meio TCM-Hepes – 70,0% e 31,0%; 60,0% e 17,0% –, e líquido folicular bovino – 71,0% e 32,0%; 29,0% e 9,0% –, respectivamente.

No experimento I, as taxas de clivagem foram similares (P>0,05) para os grupos 0h, 3h e 9h, porém houve redução nos dos grupos 6h e 12h. No entanto, essas taxas foram semelhantes para os grupos 3h, 6h, 9h e 12h (Tab. 1). Resultados mais elevados foram obtidos por Olivier et al. (1998), quando transportaram oócitos em tubos de poliestireno colocados em bolsas plásticas, gaseificadas, levadas para mini-incubadora e posteriormente colocados em banho-maria, ao obterem taxas de clivagem de 84,3% e 82,0% para o sistema de banho-maria e grupo-controle, respectivamente. As taxas de clivagem obtidas por esses autores assemelham-se às taxas de Leivas et al. (2004), que, ao submeterem oócitos ao transporte simulado por seis, 12 e 18 horas em meio de maturação TCM (sais de Earle) + Hepes, em banho-maria a 39°C, alcançaram taxas de clivagem de 81,5%, 85,4% e 76,1%, respectivamente. Carvalho et al. (2007) obtiveram resultados semelhantes, pois, ao testarem a eficiência do SIBC com injeção do ar

Transporte de oócitos...

expirado dos pulmões em comparação ao SIC e usarem diferentes meios de cultivo – SOF e CR₂ –, não observaram diferença entre os sistemas quanto às taxas de clivagem, independentemente

dos meios de cultivo utilizados – SOF de 81,7% e 71,0%, respectivamente e CR₂ de 76,2% e 79,4%, respectivamente.

Tabela 1. Desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos obtidos de oócitos mantidos em meio de transporte-maturação adicionado de hormônios, por diferentes períodos de tempo, sem controle da atmosfera gasosa

Tratamento	% clivagem Dia 3	% blastocistos Dia 7
0h	59,7±6,5a	38,0±5,8a
Transporte 3h	53,5±10,2ab	32,3±6,2a
Transporte 6h	46,1±10,0b	27,3±4,9ab
Transporte 9h	48,8±8,0ab	24,8±6,2ab
Transporte 12h	43,8±11,0b	18,9±3,8b

Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença ($P < 0,05$) entre tratamentos

No experimento I, as taxas de blastocistos encontradas assemelham-se às observadas por Olivier et al. (1998), quando transportaram oócitos em tubos de poliestireno colocados em bolsas plásticas gaseificadas e obtiveram taxas de blastocistos de 23,1% e 30,9% para o sistema do banho-maria e do grupo-controle, respectivamente. Resultados similares também foram encontrados por Carvalho et al. (2007), quando compararam a eficiência do SIBC e a do SIC, e obtiveram taxas de blastocistos para o SIC de 41,6% e 28,6%, e para o SIBC de 42,8% e 34,1%, utilizando os meios SOF e CR₂, respectivamente. No entanto, resultados mais elevados foram encontrados por Vajta et al. (1997), quando utilizaram bolsas plásticas gaseificadas com 5% de CO₂ ou com o ar expirado dos pulmões para o transporte de oócitos e obtiveram taxas de blastocistos de 46% e 47%, respectivamente. No método de transporte de oócitos utilizado no presente estudo, não houve o controle da atmosfera gasosa, entretanto Suzuki et al. (1997), ao usarem estufa de CO₂ portátil, obtiveram taxa de blastocisto mais baixa (15,3%), o que demonstra que o método pode ser utilizado com eficiência, principalmente por ser prático e menos dispendioso e trabalhoso, melhorando o custo-benefício da técnica para utilização a campo.

As taxas de blastocistos no experimento I foram semelhantes ($P > 0,05$) para grupos 0h, 3h, 6h e 9h, porém houve redução no grupo 12h em relação ao grupo 0h, e taxas semelhantes entre os grupos 6h, 9h e 12h (Tab. 1). Wrenzycki et al. (2004) e Rizos et al. (2002) citaram que a taxa máxima obtida de blastocisto bovino está em

torno de 30-40%, no entanto Leivas et al. (2004) afirmaram que oócitos submetidos ao transporte simulado em banho-maria por 6h (19,2%) e 12h (21,4%), em meio de maturação TCM (sais de Earle's) + Hepes, alcançaram taxas mais altas de blastocistos. Lehmkuhl et al. (2000) afirmaram que o transporte de oócitos bovinos em líquido folicular bovino produziu taxas viáveis de blastocistos de 22,3%, 19,4%, 24,4% e 26,7% para o grupo-controle e para os grupos submetidos ao transporte por duas, quatro e seis horas, respectivamente. Portanto, se se considerar essas taxas de blastocistos, pode-se afirmar que o transporte simulado de oócitos bovinos no meio de transporte-maturação utilizado neste estudo é viável por períodos de até nove horas.

O meio utilizado para o transporte é um dos principais fatores que interfere na PIVE (Garcia et al., 1998). A utilização dos meios de transporte-maturação de oócitos bovinos, com ou sem a adição dos hormônios, objeto do presente estudo, é importante para o posterior desenvolvimento embrionário, pois proporciona aos oócitos condições adequadas de maturação, mesmo durante o transporte, auxiliando no processo de capacitação oocitária. Em ambos os experimentos, o meio de transporte-maturação foi constituído de TCM-199 (Sais de Earle), adicionado de bicarbonato e Hepes. O bicarbonato e o Hepes são tampões que evitam grandes variações de pH nos meios de transporte, maturação e cultivo embrionário, sendo o primeiro dependente de CO₂ e o segundo não dependente, ou seja, esse último é ideal para ser

utilizado no transporte-maturação de oócitos sem controle da atmosfera gasosa.

Twagiramungu et al. (1998), ao estudarem o transporte de oócitos por seis horas em meios TCM-199 e TCM-199 + Hepes, obtiveram taxas de blastocistos de 25,0% e 26,0%, resultados semelhantes aos do presente trabalho, quando se realizou o transporte por seis e nove horas em meio TCM-199 + bicarbonato + Hepes, e verificaram taxas de blastocistos de 27,3% e 24,8%, respectivamente. Entretanto, Alm et al. (2008), ao estudarem o efeito da manutenção de oócitos bovinos em uma mistura contendo 40% de TCM 199 (Sais de Earle) + 40% de TCM 199 (Sais de Hanks) + 20% de SFB, em temperatura ambiente, por períodos de 16 a 18 horas, observaram que os oócitos mantidos na mistura tiveram menor taxa de blastocisto (16,5%) quando comparados aos do grupo-controle (29,3%), demonstrando que a manutenção dos oócitos na mistura, nos tempos e na temperatura citados acima, afeta significativamente a cinética de maturação.

Lehmkuhl et al. (2000) obtiveram taxas de blastocistos de 22,3%, 19,4%, 24,4% e 26,7% para o grupo-controle e para os grupos submetidos ao transporte por duas, quatro e seis horas, respectivamente, em líquido folicular bovino. O resultado de seis horas, semelhante aos encontrados no presente estudo (27,3%) para o mesmo tempo, no entanto, utilizou meio quimicamente definido. Resultados similares foram encontrados por Pinto et al. (2002), quando obtiveram taxas de blastocistos de 28,3% e 22,6% para os oócitos mantidos por seis horas em líquido folicular bovino e equino, respectivamente. Entretanto, Cordeiro et al. (2006), ao utilizarem para o transporte de oócitos bovinos uma solução à base de água de coco e o meio TCM 199 (Sais de Hanks), por um período de seis horas, obtiveram taxas mais elevadas de blastocistos, de 49,4% e 49,7%, respectivamente.

No experimento II, foi analisada a necessidade da adição ou não de hormônios ao meio de transporte, nos melhores períodos de tempo – três e seis horas – observados no experimento I.

Neste caso, as taxas de clivagem foram estatisticamente similares ($P>0,05$) para os oócitos dos grupos 0h, 3h com hormônios, 3h sem hormônio e 6h com e sem hormônios (Tab. 2). Os grupos foram semelhantes estatisticamente entre si, e não necessitaram da adição de hormônios ao meio de transporte-maturação para aumentar os índices de clivagem. Resultados semelhantes foram obtidos por Figueiró et al. (2004), ao avaliarem a influência da adição de LH e FSH ao meio de transporte de oócitos bovinos, utilizando SVE e SE, e observarem que a utilização do SE com ou sem a adição de hormônios resultou em taxa de clivagem de 80%, mais alta que as para o grupo SVE com (72%) e sem (61%) a adição de hormônios, respectivamente.

No experimento II, as taxas de blastocistos foram similares ($P>0,05$) para os oócitos dos grupos 0h, 3h com e sem hormônios, porém houve redução dessas taxas ($P<0,05$) nos grupos 6h com e sem hormônios. Essas taxas foram semelhantes entre os grupos 3h sem hormônios e 6h com e sem hormônios (Tab. 2).

Foi observado que os grupos 3h com e sem hormônios não diferiram entre si, e o mesmo ocorreu com os grupos 6h com e sem hormônios, portanto a adição de hormônios no meio de transporte-maturação não influenciou na taxa de produção de blastocistos. É importante salientar que os valores obtidos, até mesmo para os grupos sem hormônios, estão dentro da média de 30-40%, considerada máxima por alguns autores como Wrenzycki et al. (2004) e Rizos et al. (2002). Por esse motivo, nos respectivos períodos de tempo, os hormônios podem ou não ser adicionados. Resultados mais baixos foram obtidos por Figueiró et al. (2004), ao avaliarem a influência da adição de LH e FSH ao meio de transporte-maturação de oócitos, utilizando SVE e SE. Os autores verificaram taxas de blastocistos de 27%, 28%, 32% e 20% para os grupos com SVE + hormônios, SE + hormônios, SE e SVE, respectivamente, e afirmaram que, quando se utiliza o SVE, é necessária a adição de hormônios.

Tabela 2. Desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos obtidos de oócitos mantidos em meio de transporte-maturação adicionado ou não de hormônios, por diferentes períodos de tempo, sem controle da atmosfera gasosa

Tratamento	% Clivagem Dia 3	% Blastocistos Dia 7
0h	71,4±10,7a	46,1±3,1a
Transporte 3h com hormônios	70,3±10,4a	45,8±2,8a
Transporte 3h sem hormônios	64,8±6,5a	41,1±4,8ab
Transporte 6h com hormônios	56,0±7,9a	35,5±5,9b
Transporte 6h sem hormônios	54,1±15,0a	33,5±4,0b

Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença (P<0,05) entre tratamentos.

CONCLUSÕES

O transporte simulado de oócitos bovinos, em meio de transporte-maturação a 38,5°C, suplementado com hormônios, utilizando uma incubadora portátil sem controle da atmosfera gasosa, foi viável por um período de até nove horas, sem prejuízo do desenvolvimento embrionário *in vitro*, e a adição de hormônios ao meio de transporte-maturação de oócitos bovinos não influenciou nos índices de clivagem e de blastocistos. Por estes motivos, acredita-se que essa técnica constitui uma alternativa prática e eficiente para a remessa, até o laboratório de PIVE, de oócitos bovinos aspirados no campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-KATANANI, Y.M.; PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Effect of Season and Exposure to Heat Stress on Oocyte Competence in Holstein Cows. *J. Dairy Sci.*, v.85, p.390-396, 2002.

ALM, H.; CHOI, Y.H.; LOVE, L. et al. Holding bovine oocytes in the absence of maturation inhibitors: Kinetics of *in vitro* maturation and effect on blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, v.70, p.1024-1029, 2008.

BOONE, W.R.; SHAPIRO, S.S. Quality control in the *in vitro* fertilization laboratory. *Theriogenology*, v.33, p.23-50, 1990.

CARVALHO, C.M.f.; MIRANDA, M.S.; COSTA, N.N. et al. Cultivo *in vitro* de embriões bovinos em um sistema de incubação de baixo custo. *Acta Sci. Vet.*, v.35, supl.3, P.1202, 2007. (Resumo)

CORDEIRO, M.S. *Uso da água de coco (Cocos nucifera) como meio de manutenção de oócitos bovinos imaturos para produção in vitro de embriões*. 2006. 43f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Belém, PA.

DODE, M.A.N.; PEREIRA, D.C.; RUMPF, R. Evaluation of different methods for *in vitro* culture of a single bovine embryo. *Theriogenology*, v.59, p.340, 2003.

FIGUEIRÓ, G.M.; LEIVA, F.G.; RAUBER, L.P. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos com soro de égua ou de vaca em estro com ou sem a adição de LH/FSH. *Cienc. Rural*, v.34, p.479-484, 2004.

GARCIA, J.M. Produção *in vitro* de embriões bovinos: diferentes procedimentos. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.26, supl., p.280, 1998.

GONSALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. 408p.

GORDON, I. *Laboratory production of cattle embryo*. Cambridge: CAB International, 1994. 640p.

KAISER, G.; ALBERIO, R.; BRUN, D.S. et al. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em criotubos e em estufa portátil. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.27, supl., p.241, 1999.

LEHMKUHL, R.C.; MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A.D. et al. Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular e submetidos a FIV. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.28, supl., p.276, 2000.

- LEIVAS, F.G.; BRUN, D.S.; POZZOBON, S.E. et al. Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos mantidos em meio de maturação não gaseificado. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.25, p.414-415, 2001.
- LEIVAS, F.G.; BRUN, D.S.; MEZZALIRA, A. et al. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação sem controle de atmosfera gasosa. *Cienc. Rural*, v.34, p.219-224, 2004.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; KANKA, J. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment alter fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction*, v.126, p.333-346, 2003.
- OLIVIER, N.S.; PALMA, G.A.; ALBERTO, R. *In vitro* production of bovine embryos in water bath. *Theriogenology*, v.49, p.211, 1998.
- PALMA, G.A.; OLIVIER, N.; ALBERIO, R.H. et al. *In vitro* development and viability of bovine embryos produced without gassed incubator. *Theriogenology*, v.49, p.213, 1998.
- PINTO, M.G.L.; RUBIN, M.I.B.; SILVA, C.A.M. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos após a manutenção dos oócitos em líquido folicular equino ou bovino. *Arch. Vet. Sci.*, v.7, p.115-120, 2002.
- RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOPOULOS, S. et al. Developmental, qualitative and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, v.62, p.320-327, 2002.
- ROCHA, A.; RANDEL, R.D.; BROUSSARD, J.R. et al. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* But Not in *Bos indicus* Cows. *Theriogenology*, v.49, p.657-665, 1998.
- SCHWARTZ, J.; SCHNEIDER, M.R.; RODRIGUES, J.L. et al. Effect of short-term storage of bovine oocytes in different media and temperatures on the subsequent *in vitro* embryo development. *Theriogenology*, v.49, p.217, 1998.
- SHI, D.S.; AVERY, B.; GREVE T. Effects of temperature on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.50, p.667-674, 1998.
- SUZUKI, T.; SUMANTRI, C.; KHAN, N.H.A. et al. Development of a simple, portable carbon dioxide incubator for production of bovine IFV embryos. *Theriogenology*, v.43, p.330, 1997.
- TESSMANN, J.V. *Transporte-Maturação de oócitos bovinos em palhetas*. 2004. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.
- TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; GUILBAULT, L.A. et al. Media and time of oocytes transport influence their developmental competence for *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, v.49, p.299, 1998.
- VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T. et al. The submarine incubation system, a new tool for *in vitro* embryo culture a technique report. *Theriogenology*, v.48, p.1379-1385, 1997.
- 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, p.306, 2000.
- WATSON, A.J.; SOUZA, P.D.; CAVENEY, A. et al. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. *Biol. Reprod.*, v.62, p.355-364, 2000.
- WRENZYCKI, C.D.; HERRMANN, D.; LEMME, E. et al. Gene expression patterns in *in vitro*-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? *Anim. Reprod. Sci.*, v.82-83, p.593-603, 2004.