

## Produção *in vitro* de embriões bovinos em tubos sem controle da atmosfera gasosa

### *In vitro* production of bovine embryo in tubes without gaseous atmosphere control

Mario KURTZ FILHO<sup>1,3</sup>;  
Mara Iolanda Batistella RUBIN<sup>2</sup>;  
Carlos Antonio Mondino SILVA<sup>2</sup>;  
Lucio Pereira RAUBER<sup>1</sup>;  
Denis Faustino ALVES<sup>1</sup>;  
Manoel Francisco de SÁ FILHO<sup>2</sup>;  
José Henrique Souza da SILVA<sup>4</sup>

1- Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Ciências Rurais da UFSM, Santa Maria – RS  
2- Embryolab, Departamento de Clínica de Grandes Animais do Centro de Ciências Rurais da UFSM, Santa Maria – RS  
3- Departamento de Morfologia do Centro de Ciências da Saúde da UFSM, Santa Maria – RS  
4- Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Rurais da UFSM, Santa Maria – RS

#### Palavras-chave

Oócitos.  
Maturação *in vitro*.  
Fecundação.  
Embriões.  
HEPES.

#### Resumo

Com a maior utilização da OPU existe a necessidade de encontrar alternativas para iniciar as primeiras fases da PIV sem controle da atmosfera. O desenvolvimento de um método prático e simples de transporte/maturação/fecundação permitiria maior eficiência do laboratório e diminuição dos custos de produção. O objetivo deste estudo foi desenvolver um método de maturação e fecundação para complexos *cumulus* oócitos (CCO) em tubos de polipropileno sem gaseificação, mantidos em banho-maria. A maturação *in vitro* em estufa foi conduzida em TCM-199 modificado (controle) enquanto que para os tratamentos em banho-maria, em tubos, o meio foi acrescido de 25mM de N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico (HEPES). Na fecundação *in vitro* dos oócitos em tubos, os CCO foram mantidos em banho-maria a 39°C em Talp-Fert, acrescido de HEPES em concentrações entre 10mM a 28,7 mM por 10 a 18 horas, sob óleo mineral. O cultivo realizou-se em placas em bolsas gaseificadas com meio SOFaaci com soro de vaca em estro (SVE), sob óleo mineral, em estufa com 5,00%CO<sub>2</sub>, 5,00%O<sub>2</sub> e 90,00% de N<sub>2</sub> a 39°C, por 9 dias. Verificou-se que CCO maturados por 24h em tubos não gaseificados, mantidos em banho-maria também podem ser fecundados em meio Talp-Fert com 25 mM de HEPES, em tubos não gaseificados, mantidos em banho-maria durante 10 horas. As taxas de clivagem, blastocistos em D7 e D9 em tubos não gaseificados foram semelhantes (P>0,05) aos procedimentos em estufa. A fecundação em Talp-Fert com 10 mM a 28,7 mM de HEPES em tubos mantidos em banho-maria prejudica o desenvolvimento embrionário quando conduzida por 18 horas.

#### Correspondência para:

MARIO KURTZ FILHO  
Rua Araújo Vianna 1551/302  
97015-040 - Santa Maria – RS  
e-mail: kurtz@smail.ufsm.br ; embryolab@www.ufsm.br

Recebido para publicação: 02/09/2002  
Aprovado para publicação: 06/05/2003

## Introdução

O desenvolvimento de técnicas *in vitro* para produção de embriões de animais domésticos tem grande potencial tanto para pesquisa básica quanto para aplicações a campo. O nascimento do primeiro bezerro resultante de fecundação *in vitro* de um oócito maturado *in vivo* foi em 1981<sup>1</sup>. Posteriormente, as pesquisas se voltaram totalmente para a produção *in vitro*<sup>2,3</sup>.

A produção *in vitro* de embriões bovinos de animais de alto valor genético e zootécnico pode ser realizada em animais *postmortem*, com a coleta das gônadas, ou através da técnica de punção folicular (ovum pick up; OPU) efetuada em doadoras vivas. A OPU associada aos programas de produção *in vitro* permite a redução do intervalo entre gerações de fêmeas pré-púberes<sup>4</sup>.

Durante o processo de PIV convencional os complexos *cumulus* oócitos (CCO) são submetidos a maturação por 24 horas e incubados para fecundação por 18 a 22 horas. Após esta etapa, o cultivo é conduzido por 7 a 9 dias e este procedimento é realizado em laboratórios cujas estufas apresentam dispositivos para controle da temperatura, atmosfera e umidade.

Os fatores externos que exercem influência na competência dos oócitos e embriões são numerosos e a estabilidade e repetibilidade de um sistema de incubação devem ser levadas em consideração<sup>5</sup>. As estufas de CO<sub>2</sub> têm custo elevado, além do que a qualidade do gás utilizado é um fator econômico limitante para a produção *in vitro*. A frequência de abertura das portas da estufa modifica a temperatura e o equilíbrio do gás circulante, prejudicando o desenvolvimento embrionário. Além disso, para os programas de OPU/PIV, o uso de estufas fica restrito ao tempo que o material coletado nas propriedades chega ao laboratório. No Brasil, pela sua

grande extensão, este período pode levar várias horas, o que prejudica a maturação, enfatizando assim que as limitações ainda persistem. As pesquisas desenvolvidas com CCO obtidos através de OPU por vários autores<sup>6,7,8,9</sup> com TCM-HEPES como meio de transporte antes da maturação, por 3 a 5 horas, à temperatura ambiente, resultaram na produção exitosa de blastocistos.

A produção *in vitro* de embriões bovinos alcançou um desenvolvimento tecnológico que permite a sua aplicação comercial com êxito. Atualmente, há uma tendência para maior utilização da OPU associada a programas de transferência de embriões, e a distância entre os estabelecimentos de colheita dos oócitos e o laboratório de produção *in vitro* limita a utilização da técnica. A necessidade de encontrar uma alternativa prática e simples de transporte/maturação/fecundação de oócitos obtidos através da OPU, na própria propriedade, permitiria o aumento da abrangência dos laboratórios e diminuição dos custos de produção. A maturação dos oócitos<sup>10</sup>, assim como o cultivo de embriões<sup>11</sup> sem a utilização de estufas de cultivo é uma alternativa já utilizada.

O objetivo deste trabalho foi o de comparar o desenvolvimento de embriões bovinos maturados ou maturados e fecundados em tubos de polipropileno sem gaseificação e mantidos em banho-maria para controle da temperatura, com o desenvolvimento de embriões produzidos em condições convencionais.

## Material e Método

Os ovários bovinos utilizados nos experimentos foram obtidos de frigoríficos e transportados em solução salina com 0,90% de NaCl acrescida de 100UI/mL de penicilina G potássica (Sigma Chemical Company – P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, USA.)

entre 25 a 30°C. No laboratório, os mesmos foram novamente lavados em solução salina e mantidos em banho-maria a 30°C até a aspiração. Os folículos com diâmetro entre 2 e 8mm foram aspirados com auxílio de uma bomba de vácuo (Nevoni, Equipamento Odonto-Médico Hospitalar Ltda. Rua Dom João V, 266/280 Lapa 05.075.060 São Paulo, SP, Brasil.) e agulhas (Vacutainer, Becton Dickinson Company, NI., USA.) de 25mm x 8mm (21g) em período não superior a quatro horas após a coleta. Após a sedimentação das células no líquido folicular, procedeu-se à identificação dos complexos *cumulus* oócitos (CCO) sob estereomicroscópio (Carl Zeiss – 73446, Oberkochen, Alemanha.). Os CCO selecionados foram mantidos e a seguir lavados em três diferentes gotas de 100µL cada uma, de líquido folicular centrifugado, sendo a seguir lavados cinco vezes em gotas de 50µL com meio TCM-199 (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA.) modificado, adicionado de 25 mM de HEPES; 0,025mg/mL de piruvato de sódio e 10,00% de soro de vaca em estro (SVE) (Embryolab - Coletado e processado pela equipe. UFSM, Santa Maria, RS.). Os CCO foram classificados de acordo com De Loss et al.<sup>12</sup> e aqueles que possuíam várias camadas de células do *cumulus oophorus* claras e ooplasma homogêneo, ou seja, com qualidade 1 (excelente) e 2 (bom) foram distribuídos aleatoriamente nos diferentes tratamentos. A metodologia de coleta dos ovários, identificação/seleção dos oócitos empregados foi idêntica nos dois experimentos.

A avaliação da clivagem ao segundo (D2) e de blastocistos iniciais, blastocistos e blastocistos expandidos ao sétimo (D7) e blastocistos expandidos, blastocistos em eclosão e blastocistos eclodidos ao nono (D9) dia de desenvolvimento embrionário foi

realizada de acordo com Robertson e Nelson<sup>13</sup>, considerando-se como dia zero (D0) o dia da fecundação. Nestas avaliações, foram considerados somente os blastocistos de qualidade 1 e 2, o que foi comum aos dois experimentos.

### Experimento 1

Os complexos *cumulus* oócitos foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 25 em meio de maturação, e a fecundação foi conduzida em meio Talp-Fert com modificações de acordo com o tratamento, ou seja, estufa ou banho-maria. O sêmen congelado de um touro Red Angus foi preparado e selecionado pelo método de migração ascendente (*swim-up*) em meio Talp-Sperm com 0,06mg/mL de BSA e 0,011mg/mL de piruvato de sódio. A dose inseminante foi de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL e após a fecundação os prováveis zigotos, de todos os tratamentos, passaram por agitação mecânica durante 85 segundos para a retirada das células do *cumulus*.

A seguir, os zigotos foram lavados em TCM-HEPES e cultivados em placas de quatro poços com meio SOFaaci<sup>14</sup>, acrescido de 5,00% de SVE, sob óleo mineral e em bolsas gaseificadas com 5,00% de CO<sub>2</sub>, 5,00% de O<sub>2</sub>, 90,00% de N<sub>2</sub> e umidade saturada a 39°C, por 9 dias. As condições de maturação e fecundação utilizadas para compor os diferentes tratamentos foram as seguintes:

Maturação em estufa (ME): Os oócitos foram maturados por 24 horas em placas de quatro poços (Nunc A/S – Kamstrupvej 90 – P.O. Box 280 DK-4000 Roskilde, Dinamarca.) com meio TCM-199 com 0,025mg/mL de piruvato de sódio, 10,00% de SVE e 0,01UI de rFSHh/mL, em estufa de cultivo (W.C. HERAEUS GmbH. Postfach 1553 D-6450 Hanau 1, Alemanha.) a 39°C com 5,00% de CO<sub>2</sub>

e umidade saturada.

**Maturação em banho-maria (MB):** Os oócitos foram maturados por 24 horas em tubos de 2,0mL repletos de meio TCM-199 acrescido de 25 mM de HEPES, 0,025mg/mL de piruvato de sódio, 10,00% de SVE e 0,01UI de rFSHh/mL, em banho-maria a 39°C. Os tubos foram vedados e protegidos da luz por papel alumínio.

**Fecundação em estufa (FE):** Os oócitos foram fecundados em estufa de cultivo com 5,00% de CO<sub>2</sub>, 39°C e umidade saturada em placas de quatro poços, em meio Talp-Fert com 0,06mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 0,022mg/mL de piruvato de sódio e acrescido de 20µg/mL de heparina. No grupo MEFE 18h, a incubação dos oócitos com os espermatozoides ocorreu por um período de 18 horas. Nos demais tratamentos, este período foi de 10 horas.

**Fecundação em banho-maria (FB):** Os oócitos foram fecundados em banho-maria a 39°C, por 10 horas, em 400µL de meio Talp-Fert com 25 mM de HEPES, sob 400µL de óleo mineral contidos em tubos de polipropileno (Corning® - Corning Glass Works, Corning, N.Y.14831, USA.) de 5mL. Esses tubos foram vedados e protegidos da luz por papel alumínio.

Os grupos controle e tratamentos foram os seguintes:

**Controle 18 horas (MEFE 18h):** oócitos maturados e fecundados em estufa de cultivo. Fecundados por 18h.

**Controle 10 horas (MEFE 10h):** oócitos maturados e fecundados em estufa de cultivo. Fecundados por 10h.

**Tratamento MEFB:** oócitos maturados em estufa de cultivo e fecundados por 10h em banho-maria.

**Tratamento MBFE:** oócitos maturados em banho-maria e fecundados por 10h em estufa de cultivo.

**Tratamento MBFB:** oócitos maturados em banho-maria e fecundados por 10h em banho-maria.

**Tratamento MBaFE:** oócitos maturados em banho-maria, com troca de 1 mL do meio de maturação às 10 horas e às 22 horas após o início da maturação. Fecundação por 10h em estufa de cultivo.

**Tratamento MBaFB:** oócitos maturados em banho-maria, com troca de 1 mL do meio de maturação às 10 horas e às 22 horas após o início da maturação. Fecundação por 10 horas em banho-maria.

Em 40,00% das rotinas acima descritas, o pH do meio de maturação foi medido às 10 horas e às 22 horas após o início da mesma.

## Experimento 2

Os CCO foram distribuídos aleatoriamente, em grupos de 25 em gotas de 400µL, com o meio de maturação TCM-199 acrescido de 0,025mg/mL de piruvato de sódio, 10,00% de SVE e adicionado de 0,01UI de rFSHh/mL, constituindo os seguintes grupos:

**Controle:** a maturação dos CCO foi conduzida em placas de quatro poços Nunc, em estufa a 39°C, em atmosfera com 5,00% de CO<sub>2</sub> e umidade saturada. Essa etapa foi semelhante para os demais tratamentos deste experimento. Decorridas 24 horas da maturação, os CCO foram transferidos para o meio de fecundação, Talp-Fert com 0,06mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 0,022mg/mL de piruvato de sódio e 20µg/mL de heparina. O sêmen congelado de um touro Red Angus foi preparado e selecionado pelo método de migração ascendente (*swim-up*) em meio Talp-Sperm com 0,06mg/mL de BSA e 0,011mg/mL de piruvato de sódio. Utilizou-se a dose inseminante

de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL e os CCO foram incubados com os espermatozoides nas placas de 4 poços Nunc, em estufa, durante 18 horas. Posteriormente, os supostos zigotos foram submetidos à agitação mecânica por 85 segundos e lavados em meio TCM-HEPES. A seguir, os mesmos foram transferidos para placas com meio de cultivo SOFaaci<sup>14</sup>, com 5,00% de SVE, sob óleo mineral, em bolsas gaseificadas com 5,00% CO<sub>2</sub>, 5,00% O<sub>2</sub> e 90,00% N<sub>2</sub> e umidade saturada, a 39°C em estufa, por 9 dias. Esta fase de cultivo foi idêntica para os tratamentos seguintes.

**Tratamento 1 (10 mM):** a maturação e cultivo foram conduzidos de forma semelhante ao Controle, porém a fecundação ocorreu em tubos de polipropileno (Corning® - Corning Glass Works, Corning, N.Y.14831, USA.) (com capacidade para 2mL) em 400µL de meio Talp-Fert, acrescido de 10 mM de HEPES, sob 400µL de óleo mineral. Os tubos foram protegidos de radiação luminosa com papel alumínio e submetidos por 18 horas a 39°C, em banho-maria.

**Tratamento 2 (25 mM):** semelhante ao T1, porém o meio Talp-Fert foi acrescido de 25 mM de HEPES.

**Tratamento 3 (27,5 mM):** semelhante ao T1, porém o meio Talp-Fert foi acrescido de 27,5 mM de HEPES.

**Tratamento 4 (28,7 mM):** semelhante ao T1, porém ao meio Talp-Fert acrescentou-se 28,7 mM de HEPES.

Em 70,00% das rotinas, o pH do meio de todos os tratamentos foi medido após o término das 18 horas de fecundação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. No Experimento 1, foram realizadas 8 repetições e, para a análise estatística,

utilizou-se o teste Tukey, sendo que as variáveis foram modificadas pelo arco seno da raiz quadrada. Já no Experimento 2, foram efetuadas 4 repetições. A análise efetuada foi o teste Qui-quadrado, e o nível de significância em ambos os experimentos foi de 5,00%.

## Resultados e Discussão

Os tratamentos cujos oócitos foram maturados em banho-maria e fecundados na estufa por 10 horas (MBFE e MBaFE) não diferiram ( $P > 0,05.00\%$ ) dos oócitos maturados e fecundados em estufa por 18 horas (MEFE18h), assim como o Controle fecundado por 10 horas (MEFE10h). A produção de blastocistos em D7 foi menor ( $P < 0,05.00\%$ ) no tratamento MBaFB quando comparada ao Controle 18 horas (MEFE18h) e 10 horas (MEFE10h). Essa diferença também foi observada na produção de blastocistos em D9. Os resultados de blastocistos eclodidos não apresentaram diferença ( $P > 0,05.00\%$ ) entre os tratamentos, como pode ser observado na Figura 1.

Utilizando um período de 24 horas para a fecundação em meio com 25 mM de HEPES, Keskintepe e Brackett<sup>15</sup> observaram efeito negativo na produção de blastocistos, obtendo 58,20% de clivagem e 27,30% em D7. No presente experimento, com concentração semelhante de HEPES, mas com o período de 10h de fecundação, não se observou efeito prejudicial do HEPES sobre as taxas embrionárias. Bagger, Byskov e Christinasen<sup>16</sup> observaram degeneração de oócitos de camundongos quando o HEPES foi adicionado ao meio.

O meio TCM-199 com 25 mM de HEPES foi utilizado por Leivas et al.<sup>17</sup> que evidenciaram sua eficiência para manutenção/transporte de oócitos bovinos por até 12 horas sem controle

da atmosfera gasosa. No presente estudo, com algumas modificações da técnica empregada por esses autores, foi possível completar as 24 horas de maturação com uso do banho-maria, dispensando, assim, a necessidade do controle da atmosfera gasosa.

Sabe-se que a variação do pH dos meios de cultivo afeta de forma significativa a produção de embriões e que os melhores resultados na taxa de blastocistos são observados com pH 7,45<sup>11</sup>, conclusões semelhantes foram obtidas por Montagner et al.<sup>18</sup> com o uso de 25 mM de HEPES para a maturação, constatando que o mesmo minimiza a variação de pH e conseqüentemente incrementa os índices de blastocistos. Similar observação foi verificada nesta pesquisa quando se mensurou o pH às 10 e às 22 horas após o início da maturação. Como o pH manteve-se estável em 7,4 nas diferentes avaliações, atribui-se ao mesmo o sucesso da produção embrionária em D7 de oócitos maturados em banho-maria, sem controle da atmosfera gasosa (MBFE; 32,62%) quando comparado com o controle MEFE10h (31,34%).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a fecundação *in vitro* por 10 horas em meio com HEPES e mantidos em banho-maria pode ser utilizada, sem diminuição na produção de blastocistos, tanto em D7 como em D9. A troca de 50,00% do meio, duas vezes, às 10 e às 22 horas após o início da maturação não incrementou as taxas de clivagem (71,51%; MEFE10h x 58,76%; MBaFE) e de blastocistos (31,34%; MEFE10h x 28,80%; MBaFE). Quando a troca foi seguida da fecundação em tubos, por 10 horas (MBaFB), as taxas de clivagem (38,37%) e de blastocistos (21,01%) reduziram ainda mais.

No Experimento 2, a manutenção dos CCO com os espermatozoides em meio Talp-Fert com concentrações de HEPES entre 10 mM e 28,7 mM por 18

horas para fecundação resultou em diferença significativa ( $P < 0,05$ ) nas taxas de clivagem e produção de blastocistos em D7 e D9 (Figura 2). Diferentemente da presente pesquisa, Keskinetepe e Brackett<sup>11</sup> realizaram toda a produção *in vitro* em estufa e o período de 24 horas para fecundação, não verificando qualquer efeito do HEPES sobre a clivagem e blastocistos em D7 com a concentração equivalente ao Tratamento 10mM. Já, com 25mM em 24 horas de fecundação, houve um efeito prejudicial sobre essas mesmas avaliações.

## Conclusões

Os complexos *cumulus* oócitos podem ser maturados com meio TCM-HEPES, em tubos mantidos em banho-maria, por 24 horas, sem controle da atmosfera gasosa.

Os complexos *cumulus* oócitos também podem ser fecundados em meio Talp-Fert com 25 mM de HEPES, em tubos mantidos em banho-maria, por 10 horas, sem controle da atmosfera gasosa.

A fecundação em Talp-Fert, com concentrações de HEPES entre 10mM e 28,7 mM em tubos mantidos em banho-maria, quando conduzida por 18 horas, prejudica o desenvolvimento embrionário.

## Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann do Lamic -UFSM, pelo apoio na produção dos meios. Ao Sr. José Carlos Medeiros Xavier pelos animais cedidos para obtenção do soro. À PECPLAN-ABS, Rosário do Sul, RS pela assistência técnica e preparo do sêmen. Ao Frigorífico JG, de Caçapava do Sul, RS e ao Frigorífico Silva, de Santa Maria, RS pela cedência dos ovários para o estudo.

## Summary

The increase in OPU utilization requires an alternative to start the early phases of PIV without a controlled atmosphere. The development of a practical and simple way to transport/mature/fertilize might enhance the efficiency of the laboratory and consequently decrease its production costs. The aim of this study was to develop a method for *cumulus* oocytes complexes (CCO) maturation and fertilization in polypropylene tubes without atmosphere control kept in water bath. The *in vitro* maturation performed with controlled atmosphere was in TCM-199 modified (control group). The water bath treatments in tubes the TCM-199 had a addition of 25 mM of N-2-hidroxyethylpiperazine-N'-2-ethanosulfonic acid (HEPES). The CCO *in vitro* fertilization was performed in Talp-Fert medium with 10mM a 28.7 mM of HEPES, under mineral oil in tubes kept in water bath at 39°C, during 10 to 18 hours. Zygotes were cultured 4 well dishes, in bag system, with SOFaa medium with 5,00% estrus cow serum, under mineral oil, in incubator with 5,00%CO<sub>2</sub>, 5,00%O<sub>2</sub> and 90,00%N<sub>2</sub>, at 39°C for 9 days. The results showed that CCO can be matured for 24 hours in tubes kept in water bath and also fertilized during 10 hours in tubes with Talp-Fert medium added of 25mM HEPES. The cleavage, D7 and D9 blastocysts rates in tubes without controlled atmosphere were similar (P>0.05) to those in the incubator procedures. However, the fertilization in Talp-Fert medium added of 10mM a 28.7 mM of HEPES in tubes kept in water bath for 18 hours had a detrimental effect on the embryonic development.

## Key-words

Oocytes.  
Maturation *in vitro*.  
Fertilization.  
Embryos.  
HEPES.

## Referências

- 1- BRACKETT, R. G. et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 1, p. 147-158, 1982.
- 2- GORDON, I. Embryo transfer breakthrough. **British Friesian Journal**, v. 69, n. 1, p. 663, 1987.
- 3- GREVE, T. *In vitro* embryo technologies in cattle with particular reference to their use in cattle breeding. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 27, n. 1, p. 22-28, 1992.
- 4- PALMA, G. A.; BREM, G. Biotecnología de la reproducción. In: PALMA, G. A. **Biotecnología de la Reproducción**. Balcarce: INTA, 2001. cap. 1, p. 1-14.
- 5- AVERY, B.; MELSTED, J. K.; GREVE, T. A novel approach for *in vitro* production of bovine embryos: use of the oxid atmosphere generating system. **Theriogenology**, v. 54, n. 8, p. 1259-1268, 2000.
- 6- FRY, R. C. et al. No difference in embryo production from oocytes collected by ovum pick-up from commercial cows when using either HEPES- or bicarbonate-buffered ivm media. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 353, 2000.
- 7- GARCIA, J. M. et al. *In vitro* production (PIV) of bovine embryos: different procedures. **Arquivos Faculdade Veterinária UFRGS**, v. 26, n. 1, p. 281, 1998.
- 8- SCHERNTHANER, W. et al. Storage of bovine oocytes after ultrasound guided follicle aspiration effects on developmental competence. In: REUNION A.E.T.E., 14., 1998, Venice. **Anais...** p. 242.
- 9- WOLF, E. et al. Recent progress in the *in vitro* production and cloning of bovine embryos. **Arquivos Faculdade Veterinária UFRGS**, v. 26, n. 1, p. 160-178, 1998.
- 10- BYRD, S. R.; FLORES-FOXWORTH, G.; WESTHUSIN, M. E. Normal ovine embryo development following *in vitro* oocyte maturation in a portable incubator in the absence of CO<sub>2</sub>. **Theriogenology**, v. 43, p. 179, 1995.
- 11- 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, n.8, p.1379-1385, 1997a.
- 12- De LOSS, F. et al. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, v. 24, n. 2, p. 197-204, 1989.
- 13- ROBERTSON, I.; NELSON, R. E. Certificação e identificação de embriões. In: STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**, 3 ed. Illinois: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 1999. p. 109-140.
- 14- HOLM, P. et al. High bovine blastocysts 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.
- 15- KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B. G. *In vitro* developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 2, p. 333-339, 1996.
- 16- BAGGER, P. V.; BYSKOV, A. G.; CHRISTINASEN, M. D. Maturation of mouse oocytes *in vitro* is influenced by alkalization during their isolation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 80, p. 251-255, 1987.
- 17- LEIVAS, F. G. et al. Transport of bovine oocyte in TCM-HEPES maturation medium without controlled atmosphere. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 726, 2002.
- 18- MONTAGNER, M. M. et al. HEPES na produção de embriões bovinos *in vitro*. **Ciência Rural**, v. 30, p. 469-474, 2000.