

Sistemas alternativos de incubação e meios de cultivo para produção *in vitro* de embrião bovino¹

Alternative systems of incubation and cultivation medium to in vitro embryo production of bovine

Moysés dos Santos *Miranda*, Carla Maria Figueiredo de *Carvalho*, Marcela da Silva *Cordeiro*, Simone do Socorro *Damasceno Santos*, Otávio Mitio *Ohashi*²

Laboratório de Fecundação *in vitro*, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 66900-110, Brasil

²Correspondência: ohashi@ufpa.br

Resumo

A técnica de Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE) está em processo de acelerada difusão e desenvolvimento, entretanto, uma de suas limitações é o custo do embrião produzido, que ainda continua alto em função da necessidade de infra-estrutura laboratorial específica. Portanto, o objetivo deste trabalho foi colocar em discussão a utilização de meios de cultivos e sistemas de incubação alternativos na PIVE. A solução à base de água de coco já foi testada em substituição aos meios de manutenção/transporte, maturação de oócitos e cultivo *in vitro* de embrião bovino com resultados bastante satisfatórios. Diversos métodos e sistemas de incubação de baixo custo foram avaliados em substituição a estufa de cultivo convencional, todos com bons resultados em relação à taxa de blastocisto, inclusive de gestação. Apesar dos avanços obtidos, ainda são necessários mais estudos com relação aos métodos alternativos para a PIVE, especialmente no que diz respeito aos meios de cultivo de gametas e embriões.

Palavra chave: fecundação *in vitro*, água de coco.

Abstract

The technic of in vitro embryo production (IVEP) is in acellerated process of diffusion and development, however, one of the limitations is the cost of the embryo produced by such technic which is still high due to the necessity of a specific laboratorial infrastructure. Then, the objective of this paper was to bring to discussion the use of alternative culture medium and incubation systems in the process of IVEP. The coconut water solution was already tested as maintenance/transportation medium and presented the same results as the TCM199 hepes medium. The coconut water was also used in the process of maturation and cultivation of the zygote produced in vitro with satisfactory results. Several methods and incubation systems of low cost were tested in order to substitute the convencional incubator system and all of them presented good results in relation to the blastocyst and pregnancy rates. In spite of the advances on this concern more studies are still necessary in relation to the alternative system of IVEP process, mainly in relation to the cultivation medium of oocytes and embryos.

Keywords: *in vitro* fertilization, coconut water.

Introdução

Os aperfeiçoamentos obtidos no processo de Produção *In Vitro* de Embrião (PIVE), não só do ponto de vista quantitativo, mas principalmente qualitativo, possibilitaram taxas atuais de gestação ao redor de 50% com embriões a fresco e 40% com embrião congelado (Leeuw, 2006), fato que viabilizou a aplicação desta técnica em escala comercial, tornando-a competitiva com relação à técnica de Superovulação (SOV). Por este motivo, atualmente a PIVE está em processo de acelerada difusão e desenvolvimento, especialmente na pecuária brasileira, onde segundo Camargo *et al.* (2006) mais de 40% dos embriões transferidos no ano de 2004 foram produzidos *in vitro*.

Entretanto, uma das limitações desta técnica é o custo do embrião produzido, que ainda continua alto em função da necessidade de infra-estrutura laboratorial, que inclui equipamentos importados e de alto custo, bem como meios e reagentes para o cultivo celular/embrião, em sua maioria, também de origem importada e de difícil aquisição. Neste sentido, pesquisas têm sido realizadas visando a redução destes custos através do desenvolvimento de sistemas alternativos, avaliando novos meios de cultivo para oócitos e embriões (Blume *et al.*, 1997a; 1997b; Cordeiro, 2006), bem como, desenvolvendo sistemas de incubação, tais como cultivo em tubos de ensaio previamente gaseificados e mantidos em um aparelho de banho-maria (Wang *et al.*, 1992, Olivier *et al.*, 1998), uso de bolsas impermeáveis gaseificadas com misturas comerciais de CO₂, O₂ e N₂ ou

¹Palestra apresentada no XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 31 de maio a 02 de junho de 2007, Curitiba, PR.

mesmo ar expelido dos pulmões em substituição ao cilindro de mistura gasosa, submersas em aparelhos de banho-maria ou de estufas de calor (Vajta *et al.*, 1997; Palma *et al.*, 1998).

Água de coco como meio de manutenção/transporte de oócitos

O processo de PIVE comercial abrange várias etapas que iniciam na fazenda com a aspiração folicular (OPU- *Ovum Pick-up*), rastreamento e seleção dos oócitos a serem transportados até o laboratório o qual, invariavelmente, está localizado distante do local da aspiração, muitas vezes até em outros estados. Nesse contexto, a utilização de um meio de transporte que mantenha a viabilidade/competência oocitária e preserve sua capacidade de sofrer maturação, fecundação e assim produzir embriões viáveis é fundamental.

Atualmente, o meio mais utilizado durante a manipulação de oócitos e especialmente no seu transporte até o laboratório é o TCM 199 com tampão Hepes. Entretanto, tendo em vista a eficiência que a solução à base de água de coco tem demonstrado na preservação de sêmen de caprinos (Nunes *et al.*, 1996), ovinos (Nunes, 1997) e mesmo humano (Nunes, 1998), deu suporte à hipótese de que a mesma seria também eficiente na preservação de gametas femininos. Sendo assim, Cordeiro (2006) testou um meio à base de água de coco (osmolaridade final: 290 mOsmol/L e pH: 7,2) na manutenção de oócitos bovinos comparativamente com o meio TCM 199-Hepes em diferentes períodos de transporte (6, 9 e 12 horas).

Conforme observado na Tab. 1 não houve diferença ($p > 0,05$) com relação à taxa de clivagem, blastocisto e eclosão entre o grupo Controle (início da maturação logo após a aspiração) e os grupos mantidos por 6 horas em TCM 199-Hepes ou Solução à base de Água de Coco (H-6 e C-6, respectivamente). Entretanto, as taxas de blastocisto dos grupos H-9, H-12, C-9 e C-12 foram inferiores quando comparado aos grupos controle, H-6 e C-6 ($p < 0,05$), embora as taxas de clivagem e eclosão não tenham apresentado redução significativa ($P > 0,05$). Portanto, estes resultados indicam que a solução à base de água de coco e o TCM 199-Hepes foram igualmente eficazes em preservar a viabilidade do oócito para o processo de PIVE por até 6h.

Tabela 1. Desenvolvimento embrionário após 6, 9 e 12 horas de manutenção em TCM 199-Hepes ou solução à base de água de coco.

Grupos	n Oócitos	Tempo de Manutenção + MIV	Clivagem % m±sd	Blastocisto % m±sd	Eclosão* % m±sd
Controle	116	0 + 24	79.5 ± 3,0	50.9 ± 8,7 ^a	70.1 ± 6,0
H-6	73	6 + 18	75.9 ± 3,7	49.7 ± 7,3 ^a	69.3 ± 5,8
C-6	72	6 + 18	80.2 ± 3,0	49.4 ± 4,1 ^a	78.7 ± 10,7
H-9	67	9 + 15	74.9 ± 11,5	33.9 ± 8,7 ^b	74.2 ± 10,1
C-9	68	9 + 15	78.1 ± 5,6	35.9 ± 8,9 ^b	69.4 ± 12,5
H-12	71	12 + 12	71.2 ± 9,2	34.2 ± 6,0 ^b	50.5 ± 6,3
C-12	68	12 + 12	75.3 ± 4,6	35.6 ± 5,6 ^b	71.5 ± 15,9

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$); Grupos H-6, H-9 e H-12 (oócitos mantidos em TCM 199-Hepes por 6, 9 e 12h respectivamente); Grupos C-6, C-9 e C-12 (oócitos mantidos em solução à base de água de coco por 6, 9 e 12h respectivamente); MIV – maturação *in vitro*; m±sd – média ± desvio padrão; *Taxa de Eclosão pelo total de blastocistos.

Pinto *et al.*, (2002) e Alves *et al.* (2003), também verificaram que a manutenção de oócitos por seis horas em líquido folicular bovino não influenciou na taxa do desenvolvimento embrionário. Resultados similares também foram obtidos por Twagiramungu *et al.* (1998) com TCM 199 e TCM 199-Hepes a 38,5 °C e Leivas *et al.* (2001) com TCM 199 a 39 °C, entretanto, em ambos os casos, os meios de manutenção foram suplementados com hormônios hipofisários.

Portanto, mais estudos são necessários, como a avaliação da solução à base de água de coco enriquecida com reagentes mais específicos e necessários para cultivo de gametas e embriões objetivando manter a viabilidade dos oócitos em tempos de transporte superiores a 6 horas, além do seu emprego como meio de maturação e cultivo *in vitro* de embrião bovino.

Água de coco como meio de maturação de oócito e cultivo de embrião bovino *in vitro*

O uso da água de coco *in natura* e enriquecida (com soro fetal bovino –SFB ou com albumina sérica bovina – BSA), com correção do pH para 7,2 e osmolaridade de 308 mOsmol/L, já foi avaliado comparativamente com o meio TCM 199 (Grupo controle) no processo de maturação de oócitos bovinos (Blume *et al.*, 1997a), bem como, no cultivo de embriões obtidos pela técnica de fecundação *in vitro* (Blume *et al.*, 1997b), cujo resultado está resumido na Tab. 2.

Tabela 2. Desenvolvimento embrionário a partir de oócitos (tipo 1) maturados e zigotos cultivados em TCM 199 ou água de coco.

	Grupo controle TCM 199	Água de coco <i>in</i> <i>natura</i>	Água de coco + SFB	Água de coco + BSA
*Tx. de Maturação (oócito tipo 1)	50/76 (66%)	36/45 (80%)	61/101 (60%)	48/88 (54%)
*Tx. de Clivagem ↓	47/91 ^a (51,6%)	49/134 ^b (36,5%)	58/127 ^c (45,6%)	64/136 ^c (47%)
**Tx. de Blastocisto eclodido	16/47 (34%)	10/49 (20,4%)	13/56 (23,2%)	14/64 (21,8%)

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$); *Fonte = Blume *et al.*, (1997^a); Tx.=taxa; **Fonte = Blume *et al.*, (1997b).

Pela análise dos dados as taxas de clivagem e eclosão não diferiram do grupo controle ($p > 0,05$), concluindo-se que a água de coco pode ser usada na maturação de oócitos (Blume *et al.*, 1997a), bem como, no cultivo do zigoto bovino até o estágio de blastocisto (Blume *et al.*, 1997b). Entretanto, deve-se observar que a taxa de clivagem foi maior no meio convencional em comparação aos meios à base de água de coco, o que indica a necessidade de mais estudos relacionados à suplementação com hormônios, fatores de crescimento, aminoácidos, etc., com o objetivo de melhorar o processo de maturação e, conseqüentemente, o desenvolvimento de embriões viáveis.

Sistemas alternativos para cultivo de oócito/embrião

Vajta *et al.* (1997) desenvolveu um sistema alternativo para cultivo de oócito/embrião que foi bastante difundido através de cursos ministrados, inclusive no Brasil, que consisti no cultivo do oócito/embrião em bolsas plásticas, as quais, após a colocação da placa de cultivo em seu interior, são gaseificadas com uma mistura gasosa industrial contendo 5% de CO₂ e seladas. Em seguida as bolsas são colocadas em pequenas estantes e submersas em banho-maria a 38,7 °C. Este sistema foi denominado de “Sistema Submarino” para cultivo de embriões.

O sistema submarino de incubação foi testado experimentalmente (Vajta *et al.*, 1997) comparando a mistura gasosa industrial com 5% de CO₂ e o ar expirado dos pulmões. Ambos os sistemas renderam taxa de blastocisto similares (46% vs. 47%, respectivamente; $p > 0,05$), demonstrando a eficiência do sistema submarino para cultivo de embrião, mesmo utilizando o ar pulmonar. Vajta também observou que não houve influência da pressão da água, bem como, transparência da bolsa plástica, sobre a taxa de blastocisto. Este estudo não possuiu dados relacionados à taxa de prenhez.

Olivier *et al.* (1998) cultivou oócitos/embriões em tubos de polystyrol colocados abertos em bolsas plásticas de polietileno, que foram gaseificados e lacradas e posteriormente colocadas em mini-incubadora durante 60 minutos para atingirem o pH de cultivo e a temperatura de 38,5 °C. Após todos esses procedimentos os tubos, ainda dentro da bolsa plástica, eram hermeticamente fechados e colocados no banho-maria. A taxa de clivagem foi de 84,3 e 82,0% ($p > 0,05$) e de blastocisto foi de 23,1 e 30,9% ($p > 0,05$) para o sistema do banho-maria e do grupo controle, respectivamente.

Dong *et al.* (2001) desenvolveu uma incubadora portátil adaptada a uma bomba de vácuo para produzir uma pressão negativa de 300 mmHg. O gás carbônico era produzido adicionando-se 5 ml de água a uma mistura de 0,35g de grânulos efervescentes, o qual era constituído por 420 mg de ácido tartárico, 460 mg de NaHCO₃ e 10 mg de fibra de silicone por grama do grânulo efervescente. A pressão negativa de 300mmHg e os grânulos efervescentes eram trocados a cada três dias. Foram testados dois meios de cultivo (CR1aa e CR2aa) com diferentes concentrações (0, 50, 100 e 200 ng/ml) de Hormônio de crescimento (GH). Os autores observaram que quando o meio de cultivo utilizado foi o CR1aa, o GH, independentemente da concentração, apresentou melhor resultado em relação a taxa de maturação oocitária e desenvolvimento do zigoto, quando o mesmo foi utilizado

durante a maturação e no cultivo do zigoto, entretanto, quando o meio foi o CR2aa, o GH apresentou melhor resultado quando foi utilizado somente durante a maturação. Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) nos resultados de fecundação, clivagem e embriões transferíveis entre a incubadora portátil e a incubadora convencional, concluindo que a incubadora portátil pode efetivamente ser usada, a campo, para a produção de embrião bovino.

Miranda (2004) desenvolveu um sistema de cultivo de baixo custo, que mostrou-se eficiente na produção de embrião *in vitro*, mas que usava um cilindro com a mistura gasosa de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, dificultando o transporte do sistema, por este motivo Ohashi (2006; informação pessoal) testou um modelo diferente de sistema de incubação alternativo (Sistema de Incubação de Baixo Custo - SIBC) constituído por um recipiente de vidro de 14,4 cm largura, 14,4 cm comprimento e 9,9 cm altura, contendo uma válvula adaptada a uma mangueira de 4 mm de diâmetro, por onde era injetado ar pulmonar para promover uma atmosfera gasosa de 4-5% de CO₂, de acordo com o proposto por Vajta *et al.* (1997). A injeção de ar pulmonar no SIBC foi realizada a cada 48 h (caso a estufa permanecesse fechada) ou todas as vezes que a mesma fosse aberta. No interior da estufa foi colocada uma grade de aço inox que serviu de bandeja para a colocação das placas de cultivo e sob esta plataforma foi preenchida com água (um centímetro de lâmina) para manutenção da umidade interna. O sistema de incubação foi mantido em um banho-maria com circulação de água, com temperatura de 38,5 °C.

O Sistema de Incubação Convencional (SIC) foi constituído de incubadora da marca FORMA Scientific (Modelo 3110) que possui controle digital de temperatura, ajustada em 38,5 °C, e um termo-sensor para o controle da atmosfera gasosa, ajustada em 5% de CO₂.

Para avaliação do SIBC, foi realizado um experimento, dividido em duas etapas. A primeira etapa foi realizada em laboratório, utilizando-se ovários de abatedouro como fonte dos oócitos para comparação dos dois sistemas de cultivo (SIBC vs. SIC). A segunda etapa foi realizada no campo (fazenda) com o objetivo de verificar a praticidade de uso do SIBC e confirmar a sua eficiência na produção de embrião de qualidade, avaliada através da taxa de gestação. Na primeira etapa, também foram avaliados dois tipos de meio de cultivo, o meio CR2 (Ronsekrans e First, 1991) e o meio SOF (Synthetic Oviduct Fluid) desenvolvido por Tervit *et al.* (1972). A referida avaliação foi realizada mediante a avaliação da taxa de maturação, clivagem, blastocisto, eclosão e qualidade do embrião (determinação do número celular embrionário).

A Tab. 3 mostra o resultado da maturação nuclear oocitária nos dois sistemas de incubação. Observa-se que não houve diferença ($p > 0,05$) entre os dois sistemas testados.

Tabela 3. Taxa de maturação nuclear de oócitos bovinos cultivados em diferentes sistemas de incubação.

Sistema de incubação	n	Taxa de metáfase II (%)
Sistema de Incubação Convencional (SIC)	51	50 (98,0)
Sistema de Incubação de Baixo custo (SIBC)	39	38 (97,4)

n = número amostral.

A Tab. 4 apresenta, de forma resumida, a taxa de clivagem e formação de blastocisto (análise quantitativa), bem como, o resultado da contagem do número de células e da taxa de eclosão embrionária (análise qualitativa). Analisando-se os resultados dos meios de cultivos CR2 e SOF, no sistema SIC, observou-se que houve diferença ($p < 0,05$) em relação à taxa de blastocisto (28,6 vs. 41,4%, respectivamente), taxa de eclosão (44,7 vs. 78,5%, respectivamente) e o número total de células ($75,8 \pm 28,9$ vs. $98,4 \pm 26,8$, respectivamente) entre os diferentes meios.

Tabela 4. Desenvolvimento embrionário e número de células embrionárias de embriões cultivados em CR2 e SOF, nos diferentes sistemas de incubação.

Grupos	n	Clivagem (%)	Blastocisto (%)	Eclosão (%)	Nº Células
SIC-CR ₂	142	108 (76,1)	41 (28,6) ^a	18 (44,7) ^a	$75,8 \pm 28,9^a$
SIC-SOF	143	116 (81,7)	58 (41,6) ^b	46 (78,5) ^b	$98,4 \pm 26,8^b$
SIBC-CR ₂	104	82 (79,4)	36 (34,1) ^a	22 (58,2) ^a	$119,5 \pm 23,0^c$
SIBC-SOF	101	71 (71,0)	42 (42,8) ^b	34 (80,5) ^b	$111,3 \pm 32,9^{bc}$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$); n = número amostral.

Em relação ao sistema SIBC, foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os meios CR2 e SOF com relação à taxa de blastocisto (34,1 vs. 42,8%, respectivamente) e eclosão (58,2 vs. 80,5%, respectivamente).

Portanto, o sistema SIBC apresentou a mesma eficiência que o sistema SIC no processo de PIVE, assim como, o meio SOF demonstra ser o meio mais indicado para o processo de PIVE, independentemente do tipo do sistema de incubação utilizado.

O resultado da segunda etapa do experimento realizado com o sistema SIBC a campo (fazenda) encontra-se resumido na Tab. 5.

Tabela 5. Resultado da PIVE em sistema de incubação de baixo custo realizado a campo (Itaituba-PA).

Doadora	Touro	Oócitos aspirados	Oócitos viáveis	Clivagem (%)	Embrião		Gestação (%)
					Grau1	Grau2	
1	1	11	10	5	3	--	1
2	1	35	24	16	8	3	3
3	2	12	8	7	7	--	2
4	3	12	9	5	1	2	1
5	3	16	11	10	4	1	1
6	4	18	14	12	5	1	2
Total		104	76	55 (72)	28 (37%)	7 (12%)	10 (35,7%)
					35 (49%)		

Foram aspiradas seis vacas doadoras, das quais foram obtidos 104 oócitos ($17,3 \pm 9,0$ oócitos/doadora), sendo 76 considerados viáveis para o processo de PIVE ($12,6 \pm 6,0$ oócitos /doadora). Todas as etapas da PIVE, ou seja, a maturação, fecundação e o cultivo *in vitro* foram realizados no SIBC, com uso do ar pulmonar. Dos 76 oócitos considerados viáveis, 55 clivaram (72%), resultando em 35 embriões (46%), sendo 28 grau 1 e sete grau 2. Somente os 28 embriões grau 1 foram transferidos, obtendo-se 10 prenhez (35,7%).

Apesar de uma taxa de prenhez satisfatória, melhores resultados seriam possíveis, tendo em vista que, durante as transferências dos embriões, foram diagnosticados quatro animais gestantes, indicando falha no processo de detecção/sincronização de estro na fazenda. Falhas desse tipo são alheias ao processo de PIVE propriamente dito, mas que influenciam negativamente no resultado da prenhez.

Palma *et al.* (1998) utilizando o sistema alternativo de cultivo do oócito/embrião em bolsa plástica, mantida em estufa sem gás, obtiveram taxa de prenhez de 28%, índice bem inferior ao do SIBC.

Em resumo, esses resultados indicam que o SIBC é eficiente no processo de PIVE, com a vantagem não só de diminuir custo do embrião/gestação, mas, principalmente, por ser um sistema portátil, de fácil transporte e montagem, mesmo a campo.

Capela de baixo custo

Paralelamente às avaliações dos meios de cultivo e sistemas de incubação de baixo custo, foi idealizado um sistema de controle do ar ambiental, denominado de “capela de baixo custo” para substituir o equipamento de fluxo laminar, responsável pela purificação do ar e, conseqüentemente, pelo controle da contaminação ambiental por fungos e bactérias.

A capela de baixo custo foi confeccionada com plásticos e estrutura feita de tubos PVC $\frac{1}{2}$ polegada, com junções desmontáveis para facilitar o seu transporte. Dentro desta capela foi colocado um equipamento esterilizador de ar da marca Sterilair.

Durante o teste a campo, atenção especial foi dada ao sistema de controle do ar e na facilidade de manuseio/utilização de modo a prevenir contaminação da amostra pelo o ambiente de manipulação dos gametas e embriões. Não foi observada nenhuma contaminação dos meios de cultivos durante a realização de todos os experimentos, confirmando a eficiência do referido equipamento em prevenir contaminações oriundas do ambiente e da manipulação.

Comentários finais

Apesar de poucos trabalhos relacionados a meios de cultivo alternativos assim como de sistemas de incubação, visando principalmente a redução dos custos da produção do embrião, observa-se que os mesmos apresentam dados bastante promissores, como verificado pela eficiência da solução à base de água de coco como meio de manutenção de oócitos e de um sistema de incubação de baixo custo no processo de PIVE.

Entretanto, ainda são necessários estudos mais abrangentes visando o aperfeiçoamento desses sistemas, especialmente com relação ao cultivo, assim como o sistema de transporte e manutenção, apesar de atualmente

existirem vários modelos de incubadoras portáteis e de fácil transporte, muitas das quais desenvolvidas especificamente para cultivo de oócito/embrião.

Referências

- Alves DF, Rauber LP, Rubin FB, Bernardi ML, Dezen D, Silva CAM, Rubin MIB.** Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.40,p.279-286, 2003.
- Blume H, Vale Filho VR, Marques Jr AP, Saturnino HM.** Avaliação da água de coco na maturação de ovócitos bovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.21, p.72-78, 1997a.
- Blume H, Vale Filho VR, Marques Jr AP, Saturnino HM.** Uso da água de coco no cultivo de embriões bovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.21, p.78-81, 1997b.
- Camargo LSA, Viana JHM, Sá WF, Ferreira AM, Ramos AA, Vale Filho VR.** Factors influencing *in vitro* embryo production. *Anim Reprod*, v.3, p.19-28, 2006.
- Cordeiro MS.** *Uso da água de coco (Cocos nucifera) como meio de manutenção de oócitos bovinos imaturos para produção in vitro de embriões.* 2006. 45f. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2006.
- Dong YJ, Varisanga MD, Mtango NR, Aono M, Aono M, Otoi T, Suzuki T.** Improvement of the culture conditions for *in vitro* production of cattle embryos in a portable CO2 INCUBATOR. *Reprod Dom Anim*, v.36, p.313-318, 2001.
- Leeuw AMW.** Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology*, v.62, p.914-925, 2006.
- Leivas FG, Brum DS, Pozzobon SE, Figueiro GM, Fülber ME, Bernardi ML, Rubin MIB, Silva CAM.** Desenvolvimento embrionário *in vitro* oócitos bovinos em meio de maturação não gaseificado. *Rev Bras Reprod Anim*, 25:414-415, 2001.
- Miranda MS.** *Avaliação de um sistema de cultivo de baixo custo na produção in vitro de embriões.* 2004. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2004.
- Nunes JF.** Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. *Rev Bras Reprod Anim*, v.22, p.109-112, 1998.
- Nunes JF.** Utilization of coconut water as diluent for caprine and ovine sêmen. *Ci Anim*, v.7, p.62-69, 1997.
- Nunes JF, Combarous Y, Oliveira LF, Teixeira MD.** Utilização da água de coco e suas frações ativas na conservação *in vitro* do sêmen na espécie caprina. *Ci Anim*, v.2, p.32-43, 1996.
- Olivier NS, Palma GA, Alberto R.** *In vitro* production of bovine embryos in water bath. *Theriogenology*, v.49, p.211, 1998. Resumo.
- Palma GA, Olivier N, Alberio RH, Brem G.** *In vitro* development and viability of bovine embryos produced without gassed incubator. *Theriogenology*, v.49, p.13, 1998 Resumo.
- Pinto MGL, Rubin MIB, Silva CAM, Bernardi ML, Pilla LFC, Dezen D, Shlestein A.** 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.
- Rosenkrans CF, First NL.** Culture of bovine zygotes to the blastocyst stage: effects of amino acids and vitamins. *Theriogenology*, v.35, p. 266, 1991. Resumo.
- Tervit HR, Whittingahm DG, Rowson LEA.** Succesful Culture *in vitro* of Sheep and Cattle Ova. *J Reprod Fertil*, v.30, p.493-497, 1972.
- Twagiramungu H, Morin N, Guilbault LA, Sirard MA, Bousquet, D.** Media and time of oocytes transport influence their developmental competence for *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, 47:299, 1998. (abstract).
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H.** The submarine incubation system, a new tool for *in vitro* embryo culture a tSchnique report. *Theriogenology*, v. 48, p.1379-1385, 1997.
- Wang WL, Jiang HS, Lu KH, Gordon I, Polge C.** The effect of gas phase on the *in vitro* development of bovine embryos derived from *in vitro* maturation and fertilization of ovarian oocytes. *Theriogenology*, v.37, p.320, 1992. Resumo.