

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NUCLEO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DESENVOLVIMENTO RURAL
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA -
AMAZÔNIA ORIENTAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Lílian Kátia Ximenes Silva

TRANSPORTE SIMULADO DE OÓCITOS BOVINOS EM
MEIO DE MATURAÇÃO POR DIFERENTES PERÍODOS DE
TEMPO SEM CONTROLE DA ATMOSFERA GASOSA

Belém
2009

Lílian Kátia Ximenes Silva

**TRANSPORTE SIMULADO DE OÓCITOS BOVINOS EM
MEIO DE MATURAÇÃO POR DIFERENTES PERÍODOS DE
TEMPO SEM CONTROLE DA ATMOSFERA GASOSA**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal.
Orientador: Prof. Dr. William Gomes Vale

**Belém
2009**

Lílian Kátia Ximenes Silva

**TRANSPORTE DE OÓCITOS BOVINOS EM MEIO DE
MATURAÇÃO POR DIFERENTES PERÍODOS DE TEMPO
SEM CONTROLE DA ATMOSFERA GASOSA**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal.

Data da aprovação. Belém - PA: ____/____/____

Banca Examinadora

Presidente e Orientador:

Prof. Dr. William Gomes Vale / UFRA

Assinatura: _____

Membro Titular:

Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro / UFRA

Assinatura: _____

Membro Titular:

Prof. Dra. Sheyla Farhayldes S. Domingues / UFPA

Assinatura: _____

Membro Suplente:

Prof. Dr. Leônidas Olegário Carvalho / UFPA

Assinatura: _____

Meu Deus, dedico a você estes anos de
trabalho, pois você foi meu alto refúgio sem o qual não teria
conseguido.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Edmilson e Lisânias, que são responsáveis pela pessoa que sou hoje, muito obrigada pelo amor incondicional, pelas correções, ensinamentos, apoio e contínuas orações.

À minha inestimável mãe, que nos momentos mais difíceis sempre me incentivou e me deu força para não desistir dos meus objetivos, seus conselhos são fortalecedores. Obrigada!

Ao meu grande amor Lung, pelo carinho, paciência, apoio e amor, que me permitiram vencer os momentos de insegurança e medo. Obrigada, amo você.

Ao meu maior tesouro, Lívia, seu amor e seu marcante sorriso são verdadeiras luzes, que iluminam a minha vida.

Ao meu irmão Cláudio, pelo amor, amizade, compreensão e apoio constante durante toda a minha vida. Você é o melhor...

À Professora Adriana, pelos ensinamentos e por ser mais que uma orientadora, uma amiga, enfim obrigada por sua presença marcante.

Ao Professor Aluízio, pelo estímulo, amizade, conselhos e orientação segura durante todos estes anos.

Ao Professor orientador Dr. William Gomes Vale, pelo apoio e incentivo recebido durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Alysson, por sua preciosa ajuda na realização prática deste trabalho. Muito obrigada pela disposição.

Ao Professor Sousa, pelo apoio, paciência e incentivo recebidos durante estes anos.

A CEBRAN, por proporcionar a realização deste trabalho.

Aos todos os funcionários da CEBRAN, em especial a Lucilene, Marilena e Pedro pela disposição e paciência.

À amiga Adriane, pela imensa contribuição e apoio na realização prática deste trabalho.

Aos funcionários e proprietários dos frigoríficos que cederam os ovários para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Pará, pela oportunidade que nos ofereceu de participar deste Curso de Pós-graduação em Ciência Animal.

À Professora Sheyla Farhayldes, Coordenadora do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, pelo estímulo e conselhos constantes durante estes anos.

À CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

O transporte dos oócitos até ao laboratório é um fator determinante que tem limitado a difusão comercial da técnica de Produção *in vitro* de embriões (PIVE). Por este motivo, a utilização de um meio de transporte-maturação que forneça maior viabilidade aos oócitos durante o transporte é fundamental. O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade do transporte simulado de oócitos bovinos em meio quimicamente definido, por diferentes períodos de tempo sem o controle da atmosfera gasosa, e a necessidade da adição de hormônios neste meio. Oócitos bovinos imaturos (n=989) obtidos de ovários de vacas abatidas em frigorífico, foram selecionados e distribuídos aleatoriamente em 2 experimentos. No experimento I, 649 oócitos foram distribuídos em 5 grupos. No grupo controle (0h), os oócitos foram maturados por 24h em meio de maturação, em estufa de CO₂ a 38,5°C. Os oócitos foram transportados em uma incubadora portátil sem controle da atmosfera gasosa a 38,5°C, por 3, 6, 9 e 12h. Os oócitos dos grupos experimentais completaram a maturação nas mesmas condições do grupo 0h. No experimento II, 340 oócitos foram distribuídos em 5 grupos. No grupo controle (0h), os oócitos foram maturados nas mesmas condições do grupo 0h do experimento I. Nos grupos experimentais, os oócitos foram transportados nas mesmas condições do experimento I, no entanto o meio de transporte-maturação foi suplementado ou não com hormônios, e o transporte ocorreu por 3h (com e sem hormônios) e 6h (com e sem hormônios). Os oócitos dos grupos experimentais completaram a maturação nas mesmas condições do grupo 0h. A fecundação foi efetuada em meio Talp-Stock por 18 a 22h e o cultivo por 7 dias em meio SOF. No experimento I, as taxas de clivagem foram estatisticamente similares (p>0,05) para os grupos 0h (64,9%) e 3h (56,2%), porém houve uma redução destas taxas nos grupos 6h (45,8%), 9h (47,1%) e 12h (44,0%), que foram semelhantes entre si. A produção de blastocistos no experimento I, não foi estatisticamente diferente (p>0,05) para os grupos 0h (38,0%) e 3h (32,3%), porém houve uma redução nestas taxas nos grupos 6h (27,3%), 9h (24,8%) e 12h (18,9%), no entanto, as taxas de blastocistos assemelham-se entre os grupos 3, 6 e 9h. No experimento II, as taxas de clivagem foram estatisticamente similares (p>0,05) para os grupos 0h (71,4%) e 3h com hormônios (70,3%), porém houve uma redução destas taxas nos grupos 3h sem hormônios (64,8%), 6h com (56,0%) e sem (54,1%) hormônios, que foram diferentes entre si. A produção de blastocistos no experimento II, foi estatisticamente similar (p>0,05) para os grupos 0h (46,1%) e 3h com hormônios (45,8%), porém houve uma redução destas taxas nos grupos 3h sem hormônios (41,1%), 6h com (35,5%) e sem (33,5%) hormônios, que foram diferentes entre si. Esses resultados indicam a possibilidade do transporte de oócitos bovinos, em meio quimicamente definido, utilizando incubadora portátil, sem controle da atmosfera gasosa, a 38,5°C, pelo período de até 9h, e que a adição de hormônios neste meio pode aumentar os índices de blastocistos.

Palavras-chave: bovinos, oócitos, transporte, PIVE.

ABSTRACT

The transport of the oocytes until the laboratory is a determining factor that has limited the commercial diffusion of the Production in vitro embryo technique (PIVE). For this reason, the use of a means of transport-maturation to provide greater viability to the oocytes during the transport is fundamental. The objective of this study was to evaluate the viability of the simulated transport of the bovine oocytes in chemically defined medium, by different periods of time without the gaseous atmosphere control, and the need for the addition of hormones in this medium. Immature bovine oocytes (n=989) obtained from bovine ovaries of cows slaughtered in a refrigerator, were selected and randomly distributed in 2 experiments. In experiment I, 649 oocytes were distributed into 5 groups. In the control group (0h), the oocytes were borne during 24h by means of maturation, in a CO₂ incubator at 38,5°C. The oocytes were transported in an incubator portable without gaseous atmosphere control at 38,5°C for 3, 6, 9 and 12h. The oocytes of experimental groups completed the maturation under the same conditions of the group 0h. In experiment II, 340 oocytes were distributed into 5 groups. In the control group (0h), the oocytes were matured during the same conditions of the group 0h of the experiment I. The experimental groups, the oocytes were transported under the same conditions of the experiment I, however the means of transport-maturation was supplemented or not with hormones, and the transport occurred in 3h (with and without hormones) and 6h (with and without hormones). The oocytes of experimental groups completed the maturation under the same conditions of the of the group 0h. The fertilization was performed in Talp-Stock by 18 to 22h and growing by 7 days in SOF medium. In experiment I, the rates of cleavage were statistically similar ($p>0,05$) to the groups 0h (64,9%) and 3h (56,2%), although there was a reduction in these rates in the groups 6h (45,8%), 9h (47,1%) and 12h (44,0%), which were similar among themselves. The production of blastocysts in experiment I, was not statistically different ($p>0,05$) for the groups 0h (38,0%) and 3h (32,3%), but there was a reduction in these rates in groups 6h (27,3%), 9h (24,8%) and 12h (18,9%), however, the rates of blastocysts are similar among the groups 3h, 6h and 9h. In experiment II, the rates of cleavage were statistically similar ($p>0,05$) to the groups 0h (71,4%) and 3h with hormones (70,3%), but there was a reduction in these rates in groups 3h without hormones (64,8%), 6h with (56,0%) and without (54,1%) hormones, which were different among themselves. The production of blastocysts in experiment II, was statistically similar ($p>0.05$) for the groups 0h (46,1%) and 3h with hormones (45,8%), but there was a reduction in these rates in groups 3h without hormones (41,1%), 6h with (35,5%) and without (33,5%) hormones, which were different among themselves. These results indicate the possibility of the transport of bovine oocytes, in chemically defined medium, using incubator portable, without gaseous atmosphere control, at 38,5°C, for the period of up to 9h, and that the addition of hormones in this medium may increase the rates of blastocysts.

Key-words: bovine, oocytes, transport, PIVE.

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1 - Desenvolvimento <i>in vitro</i> 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	37
TABELA 2 - Desenvolvimento <i>in vitro</i> 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	40

LISTA DE ABREVIATURAS

AI - Anáfase I
BSA - Albumina Sérica Bovina
BVD - Diarréia Viral Bovina
CGP - Células Germinativas Primordiais
CIV - Cultivo *in vitro*
COC - Complexo *Cumulus Oophorus*
FIV - Fertilização *in vitro*
FSH - Hormônio Folículo Estimulante
GC - Grânulos Corticais
IA - Inseminação Artificial
LH - Hormônio Luteinizante
MII - Metáfase II
MIV - Maturação *in vitro*
OPU - *Ovum Pick-up*
PBS - Solução Salina Fosfatada
PI - Prófase I
PIVE - Produção *in vitro* de Embriões
RVG - Rompimento da Vesícula Germinativa
SE - Soro de Égua
SFB - Soro Fetal Bovino
SIBC - Sistema de Incubação de Baixo Custo
SIC - Sistema de Incubação Convencional
SPTZ - Espermatozóide
SVE - Soro de Vaca em Estro
TE - Transferência de Embriões
TI - Telófase I
TS - Transporte Simulado
VG - Vesícula Germinativa
ZP – Zona Pelúcida

SUMÁRIO

	Pág.
1- INTRODUÇÃO	12
2 – OBJETIVOS	14
2.1 - Objetivo Geral	14
2.2 - Objetivos Específicos	14
3 - REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 - Oogênese	16
3.2 – Foliculogênese	17
3.3 - Crescimento e Capacitação do Oócito	18
3.4 - Maturação Oocitária	19
3.4.1 - Maturação Nuclear	20
3.4.2 - Maturação Citoplasmática	22
3.5 - Condições de Transporte de Oócitos	23
3.5.1 - Métodos utilizados no transporte de oócitos	24
3.5.2 - Substâncias utilizadas no transporte de oócitos	26
4 - MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 - Colheita do Material	30
4.2 - Punção Folicular	30
4.3 - Lavagem e Seleção dos Oócitos	30
4.4 - Delineamento Experimental	31
4.4.1 - Experimento 1: Efeito do transporte simulado de oócitos bovinos em meio de transporte-maturação suplementado com hormônios	31
4.4.2 - Experimento 2: Efeito do transporte simulado de oócitos bovinos em meio de transporte-maturação com ou sem suplementação hormonal	33
4.5 - Maturação <i>In Vitro</i> (MIV) dos Oócitos	34
4.6 - Preparo do Sêmen para a Fertilização <i>In Vitro</i> (FIV) dos Oócitos	34
4.7 - Fertilização <i>In Vitro</i> (FIV) dos Oócitos	35
4.8 - Cultivo <i>In Vitro</i> (CIV) dos Embriões	35
4.9 - Análise Estatística	35
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6 – CONCLUSÃO	41
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXOS	51

1- INTRODUÇÃO

Entre as biotécnicas aplicadas ao melhoramento genético bovino que possibilitam aumentar o número de descendentes de um animal de alto valor genético destacam-se a Inseminação Artificial (IA), a Transferência de Embriões (TE) e a Produção *in vitro* de Embriões (PIVE) (TESSMANN, 2004).

Embora em muito tenham avançado as técnicas para a PIVE, a produção de blastocistos para transferência ainda se mantém no máximo 30-40%, enquanto que produção *in vivo* chega a 60-80% (RIZOS et al., 2002a; WRENZYCKI et al., 2004; LONERGAN & FAIR, 2008). Segundo Van Wagendonk-de Leeuw (2006) nos últimos anos, importantes avanços ocorreram na PIVE da espécie bovina, não só do ponto de vista quantitativo, mas principalmente, qualitativo, possibilitando taxas atuais de gestação ao redor de 50% com embriões a fresco e 40% com embriões congelados, fato que viabilizou a aplicação desta técnica em escala comercial. 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*.

Para a PIVE bovinos, os oócitos podem ser obtidos através de ovários de vacas abatidas em frigoríficos ou de animais vivos, neste último caso, pela ovariectomia, laparoscopia ou ainda através da aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-som (OPU – *Ovum Pick-up*) (TESSMANN, 2004). Com a aplicação desta tecnologia, é possível aumentar o número de embriões produzidos *in vitro* de doadoras vivas, produzindo maior número de descendentes com genótipo superior, principalmente por diminuir o intervalo entre gerações. No entanto, para tornar esta tecnologia acessível a um maior número de criadores, muitos aspectos precisam ser estudados com o intuito de aumentar a eficiência e reduzir custos (GALLI et al., 2001).

O sucesso da OPU/PIVE depende de vários fatores, tais como: genética dos animais, raça, idade (ROCHA et al., 1998; PAZ et al., 2001); estação do ano (AL-KATANANI et al., 2002); origem e qualidade dos oócitos (RIZOS et al., 2002a), 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). Esta técnica pode ser utilizada em fêmeas com até três meses de prenhez e em novilhas a partir dos seis meses de

idade, a qual pode ser realizada até duas vezes por semana no mesmo animal por períodos longos (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, desta forma, estudos estão sendo conduzidos na busca de alternativas ideais 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., 2002a; DODE et al., 2003). Dentro deste contexto deve-se levar em consideração que no Brasil, em função da grande extensão territorial, principalmente da Região Norte, que possui o maior território do país (FARIA, 2008) as condições de transporte dos oócitos até o laboratório de PIVE são consideradas como fator limitante na produção comercial, pois, em muitos casos, este transporte pode demorar várias horas (LEIVAS et al., 2001).

As substâncias e os métodos de transporte utilizados atualmente entre os laboratórios são bastante variáveis, desde criotubos à tubos de ensaio em estufas portáteis (KAISER et al., 1999), em que o pH dos meios é controlado pelo sistema bicarbonato/CO₂ (GORDON, 1994), ou em meios que contenham um tampão orgânico (Hepes), que não necessita do controle da atmosfera, apenas com o monitoramento da temperatura (SHI et al., 1998) e do tempo de transporte (WOLF et al., 1998; WARD et al., 2000), assim como também 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).

Por estes motivos, esta pesquisa teve como objetivo avaliar um meio quimicamente definido associado ao tampão Hepes suplementado com hormônios ou não, para ser utilizado no transporte de oócitos bovinos até o laboratório, que mantenha a viabilidade dos mesmos na PIVE.

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

Avaliar a viabilidade do transporte simulado de oócitos bovinos em meio quimicamente definido, por diferentes períodos de tempo sem o controle da atmosfera gasosa.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar as taxas de clivagem e de produção de blastocistos após o transporte simulado dos oócitos bovinos por períodos de 3, 6, 9 e 12 horas em meio de transporte-maturação a 38,5°C, suplementado com hormônios, e sem controle da atmosfera gasosa.

Avaliar a viabilidade do transporte simulado de oócitos bovinos em meio quimicamente definido suplementado ou não com hormônios sem o controle do CO₂, por diferentes períodos de tempo através da determinação dos índices de clivagem e de blastocisto.

3 - REVISÃO DE LITERATURA

Atualmente, com o uso da OPU, oócitos imaturos aspirados de fêmeas de alto mérito genético podem ser maturados e fecundados *in vitro* com sêmen de igual valor e resultar em embriões viáveis à transferência para receptoras (TESSMANN, 2004). A OPU associada à PIVE já está bastante difundida mundialmente (ALVARENGA, 2003), entretanto apesar dos avanços nas técnicas de recuperação de oócitos, há poucos estudos sobre o transporte destes oócitos da fazenda até o laboratório de PIVE (WARD et al., 2000; FRY et al., 2000).

Rauber (2003) afirma que em vacas cíclicas sadias, aproximadamente 85% dos oócitos ovulados se desenvolvem até embrião. A recuperação dos oócitos com auxílio da OPU seguida de PIVE, produz em média, 15 a 20% de embriões transferíveis por colheita. Um dos motivos desta baixa produção de embriões é a grande variação nas características dos oócitos recuperados, já que os folículos puncionados, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, estão em diferentes estágios de desenvolvimento e atresia.

Blastocistos bovinos produzidos *in vitro* podem ser mantidos em meios não gaseificados (SCHNEIDER et al., 1998; MEZZALIRA et al., 1998) ou, ainda, em meios gaseificados por até 24 horas (BRUM et al., 2000), sem prejuízos às taxas de desenvolvimento embrionário e prenhez. Entretanto, o complexo *cumulus oophorus* (COC) é muito sensível às variações de temperatura e pH, sendo importante o monitoramento cuidadoso destes fatores durante os procedimentos de colheita e transporte (LEHMKUHL, 2001; ALVES, 2003; RAUBER, 2003).

Segundo Ward et al. (2000) os oócitos necessitam de condições adequadas e controladas, sendo o meio utilizado, a duração do transporte e a temperatura entre a colheita e a chegada dos oócitos no laboratório, aspectos que influenciam diretamente o desenvolvimento embrionário. Schwartz et al. (1998) afirmam ainda que a temperatura de armazenamento influencia mais no desenvolvimento embrionário que o meio utilizado.

3.1 – OOGÊNESE

A oogênese é o período compreendido entre o início de desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) da fêmea até a formação do oócito haplóide fertilizado (RUSSE, 1983). Nos mamíferos, a oogênese é iniciada durante o desenvolvimento fetal e só termina na idade reprodutiva, após a fecundação, quando ocorre a extrusão do segundo corpúsculo polar (MONIAUX et al., 1997; PICTON et al., 1998; van den HURK & ZHAO, 2005).

Segundo Gilbert (2000) e Van den Hurk & Zhao (2005) o processo de formação oocitária inclui as seguintes etapas: 1) formação das CGP; 2) migração das CGP para a gônada indiferenciada (crista genital); 3) colonização da gônada pelas CGP; 4) diferenciação das CGP para oogônias através de divisões mitóticas; 5) proliferação das oogônias; 6) início da meiose; 7) parada da meiose I, no estágio de diplóteno da prófase I (PI); 8) retomada da primeira divisão meiótica; 9) segunda parada da meiose no estágio de metáfase II (MII); 10) e segunda retomada da meiose, sendo que esta última somente ocorre se houver a fertilização do oócito. Sawyer et al. (2002) afirmam que durante este processo as oogônias sofrem replicação do DNA, e após a meiose, tornam-se oócitos.

As CGP sofrem várias divisões mitóticas e transformam-se em oogônias (RUSSE, 1983). Após o início da meiose as oogônias transformam-se em oócitos, estes progridem através dos estádios da prófase meiótica, a saber: leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno. Entretanto, o processo de meiose não se completa, pois ocorre a primeira parada meiótica, no estágio de diplóteno da prófase I (RUSSE, 1983; van den HURK & ZHAO, 2005). Segundo Pincton et al. (1998) no estágio de PI da meiose, quando várias proteínas de reparação do DNA e outros fatores são necessários para o bom alinhamento e recombinação dos cromossomos, os oócitos são extremamente vulneráveis, resultando na degeneração de muitos deles.

Segundo Quetglas (2007), o bloqueio da meiose I ocorre na fase de vesícula germinativa (VG), e assim permanece por meses ou anos até a puberdade. Pouco antes da ovulação os oócitos são estimulados a retomar a meiose em resposta à onda pré-ovulatória do Hormônio Luteinizante (LH) e o ciclo celular progride até o estágio de MII, em que é novamente bloqueado. Este ciclo somente será reiniciado e completado, após a ovulação,

quando houver fecundação pelo espermatozóide (sptz) que provoca sua ativação, e uma vez ativado o oócito completa a meiose e inicia os ciclos mitóticos do desenvolvimento embrionário.

3.2 – FOLICULOGÊNESE

A foliculogênese é o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo terciário (SAUMANDE, 1981).

No estágio inicial de desenvolvimento, células foliculares pavimentosas da pré-granulosa (achatadas) e uma membrana basal se posicionam em torno dos oócitos primários, formando os folículos primordiais (MEYES, 2002), que são as unidades fundamentais dos ovários (FINDLAY et al., 2009). Posteriormente, as células foliculares tornam-se cubóides (células da granulosa) dando origem ao folículo primário (Figura 2) (SWENSON & REECE, 1996). As células foliculares multiplicam-se por mitose dando origem ao folículo secundário (Figura 3), que apresenta pelo menos duas camadas de células da granulosa, uma cavidade contendo o líquido folicular (antro) e um oócito. A teca, que consiste de camadas de células conjuntivas imediatamente ao redor da granulosa, também tem seu maior desenvolvimento durante o estágio folicular secundário (HYTTEL et al., 1997).

Segundo Hafez & Hafez (2000) a granulosa e a teca desenvolvem receptores celulares para o FSH (Hormônio Folículo Estimulante) e o LH (Hormônio Luteinizante), respectivamente (Figura 4). Sob influência do LH, as células tecais proliferam e produzem andrógenos (androstenediona e testosterona) que se difundem dentro da granulosa. O FSH promove proliferação adicional de células da granulosa e a conseqüente produção de enzimas celulares, como a aromatase, necessária para a conversão de andrógenos em estrógenos (estradiol, estriol e estrona). Os estrógenos atuam na hipófise, fazendo com que haja liberação de LH, este por sua vez atua nas células foliculares, levando a produção de progesterona. O aumento de progesterona leva a retração das células foliculares, fazendo com que as mesmas se desliguem do oócito, posteriormente ocorre o término da primeira

divisão meiótica e a liberação do primeiro corpúsculo polar, dando origem ao folículo terciário.

3.3 – CRESCIMENTO E COMPETÊNCIA OOCITÁRIA

A fase de crescimento do oócito começa juntamente com o crescimento do folículo e está quase completa quando ocorre a formação do antro. Essa fase se caracteriza pelo aumento de tamanho do oócito ainda bloqueado na meiose I, e também pelo aumento na quantidade de organelas e pela modificação da distribuição e morfologia das mesmas (HYTTEL et al., 1997).

Durante o crescimento oocitário, o ooplasma se torna um sítio de estoque de RNA e proteínas, e também acumula grânulos de glicogênio, gotas de lipídeos e corpos multivesiculares e cristalizados, que são provavelmente estruturas, associadas ao suprimento de energia e substratos para a síntese de novas membranas após a fertilização (PICTON et al., 1998). Algumas proteínas sintetizadas pelo oócito atuam na interação deste com as células da granulosa que o rodeiam, na formação da zona pelúcida (ZP), na fertilização ou no desenvolvimento embrionário inicial (PICTON et al., 1998; DEKEL, 2005). Segundo Sirard & Coenen (1994), durante esta fase, o oócito cessa, quase totalmente, sua atividade transcricional.

Hytell et al. (1997) observaram que durante o crescimento do oócito ocorre uma série de eventos que incluem: desenvolvimento de organelas, tais como retículo endoplasmático liso, complexo de Golgi, grânulos corticais (GC); formação da zona pelúcida; modificação morfológica das mitocôndrias; formação das *gap junctions* (junções comunicantes) com as células da granulosa.

A etapa entre o final do crescimento e o início da maturação *in vivo* com o pico de LH está relacionada com a aquisição final de competência para o desenvolvimento oocitário (DIELEMAN et al., 2002). Nesse período cessa a síntese de RNA e ocorre uma série de modificações ultraestruturais e o oócito ainda é mantido em seu bloqueio meiótico na PI (QUETGLAS, 2007). Hyttel et al. (1997) e Gonsalves et al. (2008) afirmam que dentre as modificações observadas neste período, inclui-se redução dos microvilos e do

complexo de Golgi, retração das ligações com as células da granulosa, aumento do espaço perivitelínico, aumento da quantidade de gotículas de lipídeos, início do deslocamento dos GC para a periferia, ondulação da membrana nuclear e modificação da morfologia do nucléolo, que poderia estar relacionada a uma retomada de sua atividade transcricional.

Atualmente tem sido relatado que a manutenção de oócitos imaturos antes do início da maturação em meios contendo inibidores da maturação pode simplificar o transporte de oócitos e auxiliar nas manipulações posteriores (ALM et al., 2008). A presença de inibidores meióticos é eficaz na manutenção de oócitos bovinos na fase de VG (ADONA et al., 2008), pois permite ao oócito maior tempo para adquirir a competência para o desenvolvimento antes de submetê-lo à maturação *in vitro* (MIV) (QUETGLAS, 2007). Segundo Hashimoto et al. (2002) o cultivo de oócitos em meios contendo estes inibidores altera a cinética da maturação, e se a fertilização for realizada após um curto período da maturação oocitária, boas taxas de blastocistos podem ser obtidas. Hashimoto et al. (2003) afirmam que o uso de inibidores do reinício da meiose, não difere a competência de desenvolvimento entre os oócitos tratados e não tratados.

Richard & Sirard (1996) 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. Segundo Emanuelli et al. (2000) estes fatores estão presentes em maior concentração nos folículos menores, cujo líquido folicular é capaz de reter a meiose, durante a incubação *in vitro*.

Blondin et al. (1997) estudando o efeito do intervalo entre o abate e a recuperação dos oócitos, observaram que melhores resultados foram obtidos, mantendo-os dentro dos folículos ovarianos por até 4h após o abate, comparativamente aos puncionados imediatamente após o abate, e que a aquisição de competência para o desenvolvimento pode ocorrer, em parte, antes da MIV.

Completada a fase de crescimento, o oócito possuirá um estoque de componentes requeridos no seu desenvolvimento subsequente e terá adquirido a capacidade de progredir do estágio de PI (VG) para MII do ciclo celular. Contudo, o oócito ainda não estará apto para a fertilização e desenvolvimento embrionário. A aquisição destas características depende da etapa posterior à fase de crescimento, ou seja, do período de maturação

oocitária, que é iniciada *in vivo* pela liberação pré-ovulatória de LH (MATTIOLI & BARBONI, 2000).

3.4 – MATURAÇÃO OOCITÁRIA

A maturação oocitária compreende o período logo após o pico pré-ovulatório de LH, quando o oócito retoma a meiose e passa pelas modificações finais que o torna apto a ser fecundado por um sptz e desenvolver-se até estágios embrionários precoces, que envolvem alterações nucleares e citoplasmáticas. Estes processos são altamente complexos e regulados por uma série de eventos moleculares (BEVERS et al., 1997; QUETGLAS, 2007; FERREIRA et al., 2008).

3.4.1 – Maturação Nuclear

A maturação nuclear do oócito bovino requer de 18 a 22h, e compreende o processo de reversão do primeiro bloqueio meiótico até o estágio de MII, quando o núcleo do oócito sai da fase de VG (rompimento da vesícula germinativa - GVBD) (BUCCIONE et al., 1990; TOSTI, 2006).

O rompimento da VG (GVBD) *in vivo* ocorre com o início da puberdade em resposta aos picos pré-ovulatórios de gonadotrofinas hipofisárias: FSH e LH (DEKEL, 2005; HUMBLOT et al., 2005; CRAIG et al., 2007).

A maturação meiótica espontânea ocorre com a punção (remoção) do oócito ou do complexo *cumulus-oophorus* (CCO) de folículos antrais (de FELICI, 1985; RODRIGUEZ & FARIN, 2004). Segundo Lanuza et al. (1998) a remoção do oócito do folículo ovariano resulta na luteinização espontânea das células da granulosa e na retomada da meiose pelo oócito. Lonergan et al. (1994) e de Souza et al. (1998) afirmam que estes eventos ocorrem pela perda da sinalização oócito-células da granulosa, realizada via junções comunicantes (*gap junctions*). Quando esta sinalização é perdida, através da retirada do oócito do ambiente folicular, ocorre à condensação da cromatina e o GVBD fazendo com que a maturação nuclear que estava bloqueada em PI da meiose I, progrida até MII. A retomada da meiose leva a inibição da maturação citoplasmática, uma vez que esta só ocorre quando

o oócito está na fase de VG, devido ao estágio descondensado dos cromossomos. Neste momento, de acordo com Silva (2008) observa-se então, uma perda na sincronia entre maturação citoplasmática e nuclear, o que influencia negativamente a aquisição de competência oocitária e provavelmente promove a reduzida taxa de produção de embriões PIV.

Segundo de Felici (1985) quando os oócitos são puncionados e cultivados *in vitro*, pode ocorrer o endurecimento da ZP. Este endurecimento ocorre naturalmente após a fecundação nos oócitos de muitas espécies e constitui um bloqueio a poliespermia. De acordo com Landim-Alvarenga et al. (2002) este endurecimento está totalmente ligado à ausência de soro fetal bovino (SFB) no meio de maturação.

A maturação nuclear é caracterizada pelo rompimento do envelope nuclear (GVBD), condensação dos cromossomos, formação do fuso meiótico e segregação (separação) dos cromossomos, com a liberação do primeiro corpúsculo polar (VORONINA & WESSEL, 2003; HUMBLOT et al., 2005; van den HURK & ZHAO, 2005; TOSTI, 2006; QUETGLAS, 2007; FERREIRA et al., 2008). Durante a maturação nuclear os cromossomos homólogos (2n) são divididos em dois grupos, com a metade do número original de cromossomos. Ao término da primeira divisão meiótica o citoplasma é dividido assimetricamente gerando duas células de tamanhos diferentes: uma pequena, chamada de primeiro corpúsculo polar e outra grande, o oócito secundário. Cada uma das células contém a metade do número de cromossomos da espécie (CAN et al., 2003).

Após o GVBD, o oócito passa pelo estágio de diacinese, metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI), completando a primeira divisão meiótica, e então, rapidamente, passa para a MII da segunda divisão meiótica, quando há novo bloqueio do ciclo celular (segundo bloqueio meiótico) (TOSTI, 2006; QUETGLAS, 2007). O oócito permanece no estágio de MII até a fecundação (MAYES & SIRARD, 2001) ou ativação partenogenética (YI & PARK, 2005), onde ocorre a retomada da meiose II, sendo gerado o segundo corpúsculo polar (SENGER, 1999). Shen et al. (2008) afirmam que nos oócitos da maioria dos mamíferos a MII, é o estágio que antecede a ovulação dos folículos.

O cálcio desempenha papel fundamental na retomada da meiose I, ao ser liberado por canais iônicos presentes na membrana plasmática de compartimentos intra e extracelulares (TOSTI, 2006).

O reinício da meiose I também é controlado por proteínas, que modulam os processos celulares através de fosforilação e defosforilação (VORONINA WESSEL, 2003; DEKEL, 2005). Entre as proteínas mais importantes que regulam o mecanismo de maturação estão as do complexo MPF (Fator Promotor de Maturação) (TAY et al. 2000; LEDAN et al., 2001; SHENG et al., 2002) e as proteínas da família MAPK (Proteína Cinase Ativada por Mitógenos) (WEHREND & MEINECKE, 2001; BODART et al., 2002; MOOD et al., 2004; DEKEL, 2005), que mostram atividade oscilatória durante o processo de maturação nuclear (TAY et al., 2000; LEDAN et al., 2001; BODART et al., 2002; SUN et al., 2004).

As proteínas do complexo MPF regulam a condensação dos cromossomos, o GVBD, e a reorganização dos microtúbulos (KIM et al., 2000). Em oócitos em estágio de VG (imaturos), o MPF mantém-se com baixa atividade. Na retomada da meiose, este torna-se ativo, atingindo sua máxima atividade em MI.

As proteínas da família MAPK atuam na fosforilação de diversos substratos incluindo fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto (ROUX & BLENIS, 2004). Em oócitos de bovinos sua ativação ocorre com a proximidade do rompimento da VG, apresentando um aumento gradual até 12-14 horas de maturação, o que sugere que a MAPK não é requerida para o reinício da meiose, mas é essencial em eventos pós-rompimento da VG (KUBELKA et al., 2000).

Os meios de cultivo utilizados na MIV são essenciais para a maturação dos oócitos bovinos, permitindo que atinjam a MII, possibilitando a fecundação, e influenciando, também, nas taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* (ROSE & BAVISTER, 1992). Estes meios podem ser divididos em simples e complexos, os simples são constituídos de uma solução salina acrescida de uma fonte energética e um tamponante de pH, sendo o sistema HEPES-Bicarbonato/CO₂ o mais utilizado, além de serem geralmente suplementados com antibióticos, SFB ou albumina sérica bovina (BSA), dentre os complexos tem-se o TCM-199 (Tissue Culture Medium). Com relação à atmosfera gasosa, o CO₂ é utilizado para controlar o pH dos meios tamponados com Bicarbonato (BOONE & SHAPIRO, 1990). O HEPES vem sendo utilizado como tampão para evitar grandes variações de pH nos meios de maturação e cultivo embrionário (FRY et al., 2000; MONTAGNER et al., 2000), além de ser o mais utilizado para remessa de oócitos coletados e destinados à PIVE.

3.4.2 – Maturação Citoplasmática

A maturação citoplasmática é um processo que envolve alterações morfológicas/moleculares e funcionais/estruturais, como: mudanças da expressão de proteínas que controlam o ciclo celular (MASUI, 1996); modificações na transcrição de RNAm`s (HAKE & RICHTER, 1997); alteração da permeabilidade da membrana plasmática (CUOMO et al., 2005); reorganização das organelas citoplasmáticas; dinâmica dos filamentos do citoesqueleto; e maturação molecular (WESSEL et al., 2001; FERREIRA et al. 2008).

Durante a maturação citoplasmática, os GC produzidos pelo complexo de Golgi mudam a sua distribuição (CRAN & ESPER, 1990; FERREIRA et al., 2008). Em PI (VG), os GC estão dispersos no córtex do oócito (PIERCE et al.,1990), enquanto que em MII, passam a se concentrar no hemisfério oposto ao dos cromossomos, e nos oócitos fertilizados estão praticamente ausentes (DUCIBELLA et al., 1988).

A maturação molecular consiste na transcrição, armazenamento e processamento do RNAm (FERREIRA et al., 2008). Segundo Meirelles et al. (2004) e Sirard et al. (2006) a transcrição e o armazenamento das proteínas no citoplasma são de fundamental importância para o processo de maturação, garantindo a progressão do desenvolvimento inicial embrionário para o estágio de oito células em bovinos, quando o genoma embrionário é ativado e a síntese de novas proteínas torna-se necessária. Esta fase é denominada Ativação do Genoma Embrionário e a expressão de determinados genes durante este período determina o sucesso da embriogênese na fase de pré-implantação.

As etapas finais de maturação dos oócitos são importantes para o bom desenvolvimento embrionário, no entanto, são poucas as informações detalhadas sobre estes processos (HUMBLLOT et al., 2005).

3.5 – CONDIÇÕES DE TRANSPORTE DE OÓCITOS

O processo de PIVE comercial abrange várias etapas, que iniciam na fazenda, com a OPU, rastreamento e seleção dos oócitos a serem transportados até o laboratório, o qual

geralmente, está localizado distante do local da aspiração, muitas vezes até em outros Estados (MIRANDA et al., 2007). No caso da Região Norte, devido sua área ser extremamente grande (FARIA, 2008), o transporte dos oócitos pode ser bastante prejudicado.

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 (MIRANDA et al., 2007).

Segundo Yang et al. (1990) a MIV de oócitos bovinos é afetada por fatores como o meio, o tempo e a temperatura de transporte destes até o laboratório de PIVE. Investigações vêm sendo conduzidas na busca de alternativas para o transporte de oócitos obtidos da OPU, do local de colheita até o laboratório de PIVE (WARD et al., 2000; GALLI et al., 2001; LEHMKUHL, 2001; RAUBER, 2003; ALVES, 2003).

3.5.1 – Métodos utilizados no transporte de oócitos

O transporte de complexos *cumulus*-oócitos vem sendo testado em tubos de poliestireno (BYRD et al., 1995; KAISER et al., 1999), com diferentes fontes de aquecimento como estufas portáteis (BYRD et al., 1995; SUZUKI et al., 1997); em placas de cultivo mantidas em bolsas plásticas seladas e gaseificadas, mantidas em banho-maria (VAJTA et al., 1997; OLIVIER et al., 1998; PALMA et al., 1998; LEIVAS et al., 2002; KURTZ FILHO, 2003); em criotubos, entre outros (TWAGIRAMUNGU et al., 1998; KAISER et al., 1999).

O uso de incubadoras portáteis ligadas a uma bateria para o transporte dos oócitos tem como objetivo, simular a MIV em laboratório, a qual é realizada em estufa de cultivo com 5% de CO₂, em meios que contenham Bicarbonato como tampão para o controle do pH (GORDON, 1994). Por outro lado, quando não se tem uma atmosfera gasosa controlada, é necessária a adição, no meio de maturação, de um tampão orgânico como o Hepes (WOLF et al., 1998; WARD et al., 2000).

Dong et al. (2001) desenvolveram uma incubadora portátil adaptada a uma bomba de vácuo, para produzir uma pressão negativa de 300 mmHg, e testaram dois meios de cultivo (CR1aa e CR2aa) com diferentes concentrações (0, 50, 100 e 200 ng/ml) de Hormônio do Crescimento (GH). Foi observado que quando o meio de cultivo utilizado foi o CR1aa, o GH, independentemente da concentração, apresentou melhor resultado em relação à taxa de maturação oocitária e ao desenvolvimento do zigoto, quando o mesmo foi utilizado durante a maturação e o cultivo do zigoto, entretanto, quando o meio foi o CR2aa, o GH apresentou melhor resultado quando foi utilizado somente durante a maturação. Os autores afirmam que não foi observada diferença ($p > 0,05$) 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.

Vajta et al. (1997) desenvolveram um sistema alternativo para cultivo de oócito/embrião que consistia na colocação das placas de cultivo dos oócitos dentro de bolsas plásticas que são gaseificadas com uma mistura gasosa industrial contendo 5% de CO₂ e então seladas. Em seguida as bolsas são colocadas em pequenas estantes e submersas

em banho-maria a 38,7° C. Os mesmos autores testaram este sistema experimentalmente comparando a mistura gasosa industrial com 5% de CO₂ e o ar expirado dos pulmões, ambos os sistemas renderam taxa de blastocistos similares (46% e 47%, respectivamente), demonstrando a eficiência deste sistema para o cultivo embrionário, mesmo utilizando o ar pulmonar. Também observaram que não houve influência da pressão da água, bem como, da transparência da bolsa plástica, sobre a taxa de blastocisto. Palma et al. (1998) utilizando o mesmo sistema alternativo de Vajta et al. (1997), no entanto com as bolsas plásticas mantidas em estufa sem gás, obtiveram taxa de prenhez de 28%.

De acordo com Olivier et al. (1998) o cultivo de oócitos/embriões em tubos de poliestireno colocados abertos em bolsas plásticas de polietileno, gaseificadas, lacradas e colocadas em mini-incubadora durante 60 minutos para atingirem o pH de cultivo e a temperatura de 38,5° C, sendo posteriormente os tubos, hermeticamente fechados e colocados em banho-maria, apresentou taxas ($p>0,05$) semelhantes de clivagem (84,3% e 82,0%) e de blastocisto (23,1% e 30,9%) para o sistema em banho-maria e do grupo controle, respectivamente.

Miranda (2004) desenvolveu um sistema de cultivo de baixo custo, que mostrou-se eficiente na PIVE, mas que usava um cilindro com a mistura gasosa de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, e de acordo com o autor o cilindro dificultava o transporte do sistema.

Carvalho et al. (2007) testaram a eficiência de um Sistema de Incubação de Baixo Custo (SIBC), com injeção do ar expirado dos pulmões, durante a PIVE bovinos. O SIBC era constituído por um recipiente de vidro, contendo uma válvula adaptada a uma mangueira por onde era injetado ar pulmonar para promover uma atmosfera gasosa em torno de 4-5% de CO₂, de acordo com o proposto por Vajta et al. (1997). O SIBC foi mantido em banho-maria com circulação de água, a uma temperatura de 38,5°C. O Sistema de Incubação Convencional (SIC) foi constituído de estufa a 38,5°C em 5% de CO₂. Na etapa do cultivo os meios SOF e CR₂ foram comparados dentro de cada sistema de incubação. Não houve diferença estatística entre o SIC e o SIBC quanto à capacidade de maturação nuclear (98,0% e 97,4%, respectivamente) e as taxas de clivagem, independente dos meios de cultivo utilizado (SOF: 81,7% e 71,0%, respectivamente; CR₂: 76,2% e 79,4%, respectivamente). Em relação às taxas de blastocistos e eclosão, o meio SOF foi superior ao meio CR₂ somente no SIC (taxa de blastocisto de 41,6% e 28,6%,

respectivamente; e taxa de eclosão de 78,5% e 44,7%, respectivamente), não havendo diferença entre os meios de cultivo no SIBC (taxa de blastocisto de 42,8% e 34,1%, respectivamente; e taxa de eclosão de 80,5% e 58,2%, respectivamente). Os autores afirmam que a PIVE bovinos pode ser realizada de forma eficaz no SIBC, sendo o SOF o meio mais adequado para este sistema de incubação.

3.5.2 – Substâncias utilizadas no transporte de oócitos

Nos trabalhos que utilizam ovários provenientes de abatedouro, o transporte dos mesmos se dá normalmente em solução salina de 0,9% de NaCl ou solução salina fosfatada 0,9% (PBS) aquecida a 35°C. O tempo transcorrido entre a obtenção dos ovários e o início da colheita, varia entre os grupos de pesquisa, mas não parece afetar a viabilidade dos oócitos, quando no período de até 3h (GONSALVES et al., 2008).

Na literatura tem sido descrito o efeito positivo do armazenamento de oócitos bovinos antes da MIV, e este fenômeno foi chamado de capacitação oocitária, como uma analogia a capacitação espermática (HYTTEL et al., 1997). Blondin et al. (1997) afirmam que os oócitos adquirem competência para o desenvolvimento posterior quando são mantidos dentro dos folículos por até 4h.

Pavlok et al. (2006) analisaram a viabilidade de oócitos bovinos armazenados em folículos isolados, prolongando o tempo de manipulação *in vitro* antes da maturação. Os folículos foram dissecados e armazenados a 17-18°C, durante 24 ou 48h, em meio TCM-199 (Sais de Earle's), após este período os oócitos foram puncionados, maturados, fertilizados, e os embriões cultivados *in vitro* durante 9 dias. Os autores observaram que o armazenamento de folículos a 17-18°C resulta na recuperação de maior número de blastocistos de melhor qualidade e permite o transporte seguro dos folículos por longa distância.

Dentre as substâncias que têm sido utilizadas por quem explora comercialmente a aspiração folicular, sem comprometimento do desenvolvimento embrionário, seja para a manutenção ou para o transporte de oócitos, pode-se citar: o TCM-199 (Sais de Earle's) acrescido de Hapes ou Bicarbonato (NUNES et al., 1996; TWAGIRAMUNGU et al., 1998; FRY et al., 2000), o Tyrode Lactato acrescido de Hapes (SCHERTHNER et al., 1998), ou o PBS (KELLER et al., 1993).

O meio TCM-199 (Sais de Earle's), acrescido de BSA também tem sido utilizado com sucesso para o armazenamento de oócitos bovinos destinados à PIVE, por períodos que variam de 5 a 10h, dependendo da temperatura utilizada (WOLF et al., 1998; SCHWARTZ et al., 1998). Twagiramungu et al. (1998) comparando diferentes meios de transporte de oócitos, previamente equilibrados em estufa, observaram que períodos de até 6h não demonstraram diferenças nas taxas de blastocistos, entre os meios TCM-199 (Sais de Earle's) (25%) e TCM-199 (Sais de Earle's) + Hepes (26%) e o grupo controle (24%), e que para períodos superiores, as taxas de blastocistos foram afetadas significativamente. Não foi observada diferença na capacidade de desenvolvimento dos oócitos mantidos em meios tamponados com Hepes ou Bicarbonato (WARD et al., 2000).

Alm et al. (2008) estudando a manutenção de oócitos bovinos imaturos em uma mistura contendo 40% de TCM 199 (Sais de Earle's), 40% de TCM 199 (Sais de Hanks) e 20% de SFB, em temperatura ambiente por períodos de 16 a 18h, observaram que não foi afetado o desenvolvimento meiótico destes oócitos. Entretanto, os oócitos mantidos na mistura tiveram menor taxa de blastocisto (16,5%) quando comparados ao grupo controle (29,3%), demonstrando que a manutenção dos oócitos na mistura, nos tempos e na temperatura citados acima afeta significativamente a cinética da maturação quando manipulações posteriores são realizadas.

Outra alternativa para a manutenção dos oócitos bovinos é o líquido folicular bovino (LEHMKUHL, 2001; RAUBER, 2003) ou eqüino (PINTO et al., 2002). O líquido folicular é um exsudato do plasma sangüíneo com diferentes fatores protéicos, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, esteróides e muitos outros metabólitos sintetizados pelas células da parede folicular (GORDON, 1994).

Segundo Rodovalho et al. (2000) a suplementação do meio de maturação com 20% de líquido folicular eqüino melhora a qualidade dos oócitos bovinos, sendo que o mesmo pode ser utilizado em substituição ao SFB. Vizcarra et al. (2000), Pinto et al. (2002) e Alves et al. (2003) afirmam que o líquido folicular bovino, obtido de folículos entre 2 e 8 mm de diâmetro, pode ser uma alternativa para a manutenção dos oócitos, por curtos períodos de tempo, até a chegada no laboratório, e de acordo com Pinto et al. (2002) e Alves et al. (2003) estes podem ser mantidos em líquido folicular bovino ou eqüino, por até 6h, a 30°C, antes da MIV. Lehmkuhl et al. (2000) observaram que o transporte de oócitos

bovinos em líquido folicular bovino por diferentes períodos de tempo, não altera o desenvolvimento embrionário, demonstrando 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 2, 4 e 6h, respectivamente.

O líquido folicular bovino proporciona graus variáveis de bloqueio da meiose, possibilitando maior sincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática (LEHMKUHL, 2001), o que é adequado para períodos curtos. Entretanto para períodos mais prolongados de transporte, o bloqueio produzido pelo líquido folicular bovino pode determinar redução no posterior desenvolvimento embrionário, embora Schwartz et al. (1998) tenham obtido bons resultados com a manutenção dos oócitos por 10h a 20°C em líquido folicular bovino.

Figueiró et al. (2000) e Figueiró et al. (2004) demonstraram a viabilidade da utilização do soro de égua em estro na PIVE bovinos e afirmam que a utilização deste pode ser uma alternativa para se evitar a contaminação dos embriões através da utilização de materiais de origem bovina como células, soro e componentes deles extraídos, que podem ser fontes potenciais da BVD (Diarréia Viral Bovina). Stringfellow (2000) também afirma que o líquido folicular eqüino, por ser heterólogo, pode prevenir a infecção dos oócitos bovinos por agentes espécie-específicos.

Pinto et al. (2002) observaram que as taxas de clivagem e blastocistos dos oócitos mantidos por 6h em líquido folicular bovino (81,1% e 28,3%) ou eqüino (82,2% e 22,6%) foram semelhantes as do grupo de oócitos maturados por 24h (85,4% e 27,5%).

Além do líquido folicular bovino e eqüino, outros meios de transporte para oócitos destinados a PIVE têm sido empregados, entre eles o TCM (Sais de Earle's) + Hepes (GARCIA et al., 1998; SCHWARTZ et al., 1998; FRY et al., 2000), o Talp-Hepes (SCHERTHANER et al., 1998; WOLF et al., 1998), e a água de coco (CORDEIRO et al., 2006). Schwartz et al. (1998) verificaram melhores resultados na PIVE bovinos após a manutenção dos oócitos em TCM (Sais de Earle's) + Hepes ou líquido folicular bovino, anteriormente a MIV, quando comparados ao Talp-Hepes.

Uma alternativa para períodos mais longos de transporte é a utilização de meios previamente equilibrados em estufa (OLIVIER et al., 1998; WARD et al., 2000), que segundo Leivas et al. (2004), apresentam resultados contraditórios, além do inconveniente da necessidade prévia de gaseificação.

Foi avaliada a influência da adição de LH e FSH no meio de transporte-maturação de oócitos bovinos destinados a PIVE com soro de vaca em estro (SVE) ou soro de égua (SE) obtido no primeiro dia do estro, obtendo-se taxa de clivagem de 80%, quando foi utilizado o SE, adicionado ou não dos hormônios, e taxa de blastocisto de 32% e 28%, quando foi utilizado somente o SE e quando no mesmo foram adicionados os hormônios, respectivamente. Portanto, para a obtenção de taxas regulares de blastocistos, não é necessária a adição de hormônios quando se utiliza o SE, e os hormônios devem ser adicionados, quando se utiliza o SVE (FIGUEIRÓ et al., 2004).

Cordeiro et al. (2006) testando um meio à base de água de coco na manutenção de oócitos bovinos comparativamente com o meio TCM 199 (Sais de Hanks) em diferentes períodos de transporte (6, 9 e 12h), observaram que a solução à base de água de coco e o TCM 199 (Sais de Hanks) foram igualmente eficazes em preservar a viabilidade do oócito para o processo de PIVE por até 6h, não havendo diferença com relação à taxa de blastocisto entre o grupo controle (50,9%) e o grupo mantido por até 6h em TCM 199 (Sais de Hanks) (49,7%) ou a solução à base de água de coco (49,4%).

Segundo Miranda et al. (2007) apesar de poucos trabalhos relacionados a meios alternativos de transporte de oócitos, observaram que os mesmos apresentam dados bastante promissores, como verificados pela eficiência da solução à base de água de coco como meio de manutenção de oócitos.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - COLHEITA DOS OVÁRIOS

Os ovários foram obtidos de fêmeas bovinas oriundas de diferentes localidades do Estado do Pará, abatidas em frigoríficos localizados no município de Castanhal/PA.

O processamento do material foi realizado no Laboratório de Fertilização *in vitro* (INVITRO) da Central de Biotecnologia de Reprodução Animal - CEBRAN/UFPA.

Após a colheita dos ovários, estes foram inicialmente lavados em álcool 70% e posteriormente em solução salina a 0,9%, e então transportados nesta mesma solução até o Laboratório, em recipiente térmico, para a manutenção da temperatura em aproximadamente 35°C.

4.2 - PUNÇÃO FOLICULAR

No laboratório, folículos com tamanho entre 2 a 8 mm de diâmetro foram aspirados através de agulha (40x12) e seringa de 20ml, já contendo o meio de manutenção (H199 – Anexo I). Após a aspiração, o líquido folicular obtido foi colocado em um tubo de centrífuga¹ de 15ml para a sedimentação dos oócitos.

4.3 - LAVAGEM E SELEÇÃO DOS OÓCITOS

O sedimento dos tubos foi colocado em uma Placa de Petri¹ (35x10 mm), e foi realizada a colheita dos oócitos, que foram então transferidos para outra placa contendo o meio TCM 199 tamponado com HEPES (H199 – Anexo I) para a lavagem dos mesmos, separação de restos celulares e posterior classificação da qualidade. Os oócitos foram classificados e selecionados através de lupa estereomicroscópica² (20x), em condições estéreis (fluxo laminar³), considerando

¹ FALCON

² NIKON SMZ 800

as características do *cumullus* (cobertura do oócito) e do citoplasma do oócito (ooplasma), assim como em oócitos com *cumullus* compacto contendo mais de três camadas de células (COC), com *cumullus* compacto contendo menos de três camadas de células, com *cumullus* expandidos (Exp), desnudos sem *cumullus* (Des), segundo Gonsalves et al. (2008). Os oócitos considerados viáveis foram lavados novamente em meio H199, para posterior utilização na MIV.

4.4 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo foi dividido em dois experimentos, onde foram determinadas as taxas de maturação *in vitro*, de clivagem e de produção de blastocistos após o transporte simulado de oócitos bovinos em meio de transporte-maturação suplementado ou não com hormônios, por diferentes períodos de tempo. No experimento I o meio foi adicionado de hormônios (MTM), e no experimento II o meio foi suplementado (MTM) ou não de hormônios (MTM I).

Para cada experimento foi utilizado um grupo controle (0h), onde os oócitos não foram submetidos ao transporte simulado, sendo os mesmos, assim que selecionados, imediatamente colocados no meio de MIV (B199 - Anexo I) e levados a estufa de CO₂. No experimento I, foram realizadas 10 repetições para cada um dos grupos (0h, 3h, 6h, 9h e 12h), num total de 649 oócitos. No experimento II, foram realizadas 5 repetições para cada um dos grupos (0h, 3h com hormônios, 3h sem hormônios, 6h com hormônios e 6h sem hormônios), num total de 340 oócitos.

4.4.1 - Experimento 1: Efeito do transporte simulado de oócitos bovinos em meio de transporte-maturação suplementado com hormônios

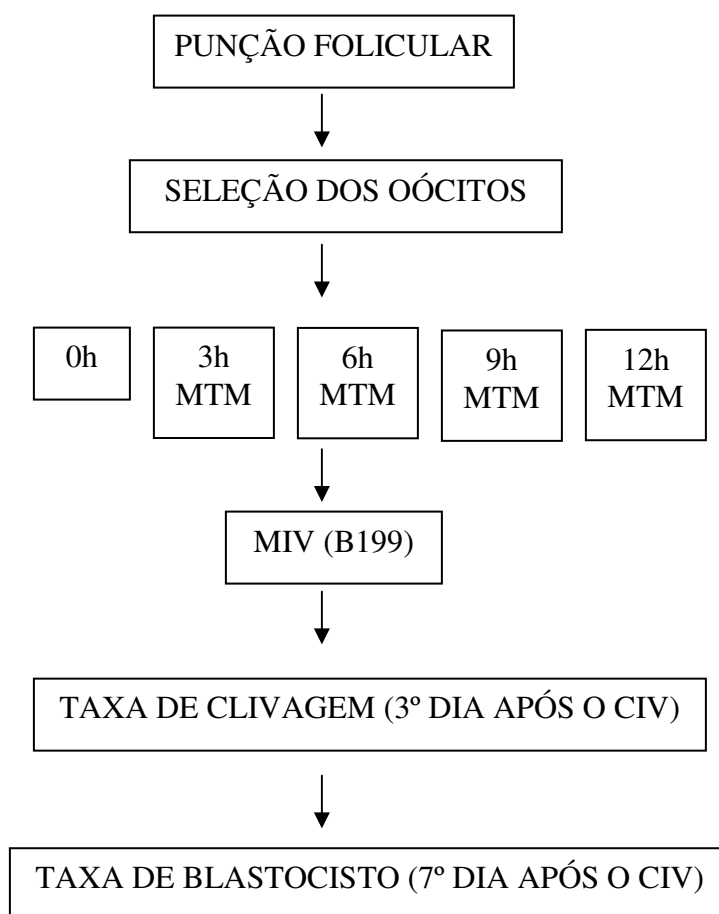
Após a seleção dos oócitos, estes foram aleatoriamente divididos em 5 grupos (0h, 3h, 6h, 9h e 12h), sendo que para o grupo 0h os oócitos foram imediatamente colocados em placas contendo meio de MIV (B199) e levados à estufa de CO₂. Nos demais grupos experimentais os oócitos permaneceram por diferentes períodos de tempo (3, 6, 9 e 12h) em

criotubos de 1,5ml contendo o meio de transporte-maturação adicionado de hormônios (MTM) mantidos na incubadora portátil⁴.

⁴ MINITUB

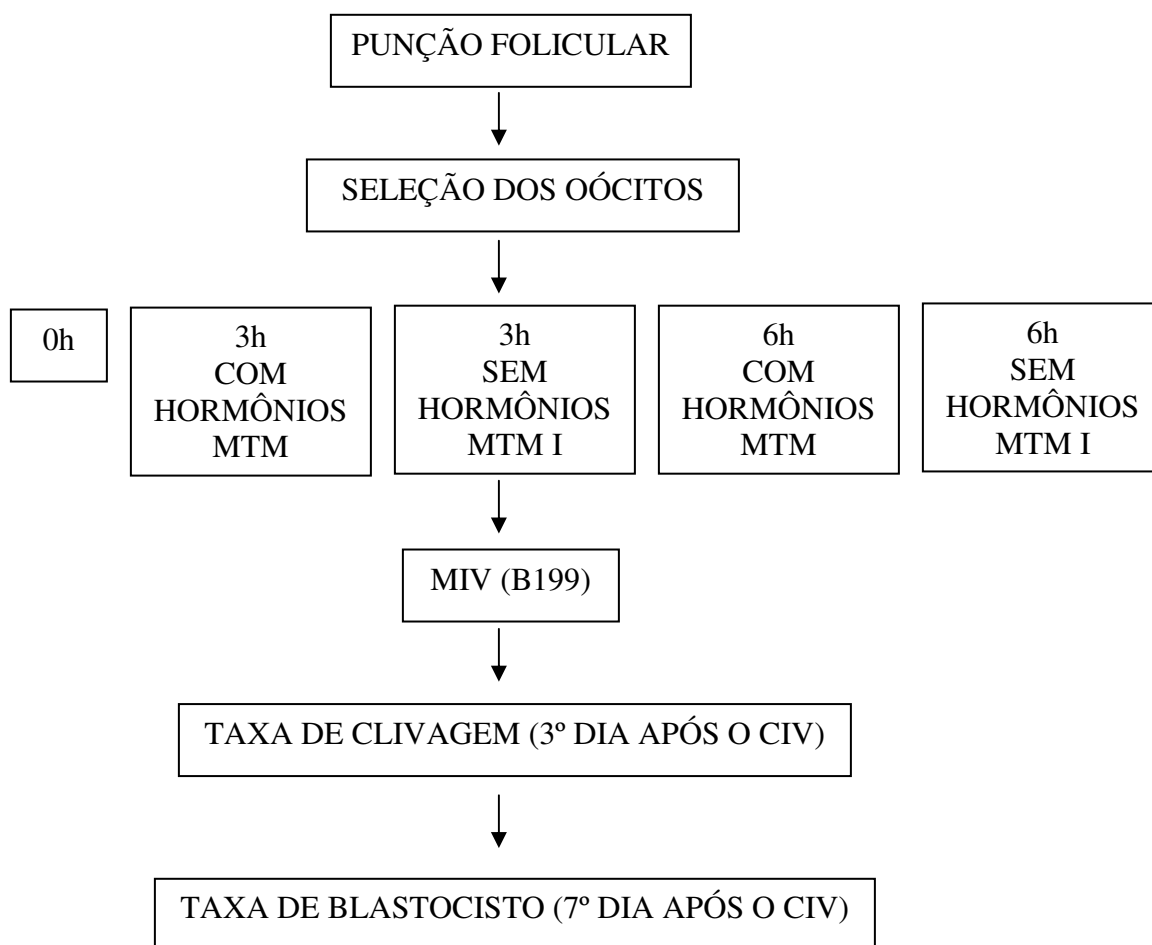
Esta incubadora portátil, destinada ao transporte de oócitos e embriões, possui em seu interior esferas metálicas, que possibilitam a manutenção rigorosa da temperatura, além de facilitar o posicionamento das células transportadas e proporcionar um ambiente absolutamente seco e higiênico, sem o controle da atmosfera gasosa.

Após transcorrido os respectivos períodos de transporte, os oócitos foram então transferidos para placas de cultivo contendo meio de MIV (B199) e levados a estufa de CO₂ nas mesmas condições do GC, onde permaneceram o tempo necessário para completar as 24h de maturação.



4.4.2 - Experimento 2: Efeito do transporte simulado de oócitos bovinos em meio de transporte-maturação com ou sem suplementação hormonal

Após a seleção dos oócitos, estes foram aleatoriamente divididos em 5 grupos (0h, 3h com hormônios, 3h sem hormônios, 6h com hormônios e 6h sem hormônios), sendo que para o grupo 0h os oócitos foram imediatamente colocados em placas contendo meio de MIV (B199) e levados à estufa de CO₂. Nos demais grupos experimentais os oócitos permaneceram por diferentes períodos de tempo (3 e 6h) em criotubos de 1,5ml contendo o meio de transporte-maturação adicionado ou não de hormônios (MTM e MTM I) mantidos na incubadora portátil. Após transcorrido os respectivos períodos de transporte os oócitos foram então transferidos para placas contendo meio de MIV (B199) e levados a estufa de CO₂, onde permaneceram o tempo necessário para completar as 24h de maturação.



4.5 - MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV) DOS OÓCITOS

A MIV dos oócitos foi realizada em placa de petri com gotas de 100 µl de meio de MIV (B199), imersas em óleo mineral, em estufa com 5% de CO₂ em ar, 38,5° C e alta umidade, por 24h.

Nos grupos 0h, os oócitos não foram submetidos ao transporte simulado, sendo imediatamente após a lavagem e seleção colocados em placas contendo meio de MIV (B199) e levados à estufa de CO₂.

Os oócitos submetidos aos transportes simulados foram mantidos em criotubos contendo 1,5ml de meio de transporte-maturação com ou sem a adição de hormônios (MTM e MTM I) por diferentes períodos de tempo, em uma incubadora portátil a 38,5°C. Após os respectivos períodos de transporte, os oócitos de cada grupo foram transferidos para placas com meio de MIV (B199), nas mesmas condições do grupo 0h, onde permaneceram o tempo necessário para completar às 24h de maturação.

4.6 - PREPARO DO SÊMEN PARA A FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* (FIV) DOS OÓCITOS

Duas doses de sêmen envasados em minitubos foram descongeladas em banho-maria a 37°C durante 30 segundos, e posteriormente, foram realizadas três lavagens em meio TL-Sêmen (Anexo II), através de centrifugações sucessivas durante 10 minutos a 200 G. O último sedimento

(*pellet*) de espermatozóides (sptzs) foi colocado em uma coluna de gradiente de Percoll 45 e 90% (Anexo II), e centrifugado por 30 minutos a 200 G, para a separação dos sptzs móveis. Os sptzs sedimentados foram lavados mais uma vez em meio TL-Sêmen, e o sedimento final foi diluído em meio de FIV (Anexo I) na proporção de 1:1. Desta solução foi retirada uma alíquota de 10 µl que foi adicionada a 190 µl de formol salino, para se determinar a concentração de sptzs na câmara de Neubauer. Após esta contagem foi feito o cálculo da concentração espermática para se saber qual a quantidade do sêmen já diluído no meio de FIV (1:1) que deverá ser colocada nas gotas de FIV, para que estas contivessem

1×10^6 sptzs/ml. Os sptzs permaneceram nas gotas de FIV durante 2h, em estufa de CO₂ nas mesmas condições citadas para a MIV, para que ocorresse a capacitação espermática.

4.7 – FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

Decorrido o período de MIV, os oócitos foram lavados imediatamente em meio de FIV (Anexo I), e então transferidos para gotas de cultivo de 100 µl do mesmo meio, já contendo os sptzs capacitados, sob óleo mineral. A incubação dos oócitos/espermatozóides foi realizada em estufa de cultivo a 38,5°C, com 5% de CO₂ em ar, com alta umidade, por um período de 18 a 22h.

4.8 - CULTIVO *IN VITRO* (CIV) DOS EMBRIÕES

Após o período de fecundação, os supostos embriões foram submetidos à pipetagens sucessivas (agitação mecânica) nas próprias gotas de FIV, para a retirada das células do *Cumulus oophorus*, restos celulares e sptzs, posteriormente foram lavados em meio SOF (Anexo II), e então transferidos para gotas de 50 µl do mesmo meio e levados à estufa de CO₂ nas mesmas condições da FIV.

A taxa de clivagem foi analisada 72h (3^o dia) após o início do CIV, quando foi realizada a primeira suplementação alimentar, ou seja, acréscimo de 50 µl de meio SOF recém-preparado (1^o *feeding*) nas gotas de cultivo. O 2^o *feeding* foi feito no 5^o dia, onde foi retirado 50 µl do meio já metabolizado pelos embriões e acrescentado mais 50 µl do meio recém-preparado. No 7^o dia foi observada a taxa de blastocistos.

4.9 - Análise Estatística

Para análise dos dados foi utilizado o software BioEstat 2.0 através dos parâmetros de estatística descritiva como média e desvio padrão, além do teste de análise de variância com dupla entrada (two away), para determinação da interação entre as variáveis tempo e taxa de clivagem e taxa de blastocistos a serem testadas, estabelecendo-se 5% como nível de confiança ($p < 0,05$). Com o intuito de estabelecer a diferença estatística entre os

diferentes tratamentos foi usado o Teste Bonferroni também com nível de confiança de 5% ($p < 0,05$).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi observado 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 & Shapiro (1990) contribui para a obtenção de altas taxas 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 57,4% e 34,3%, respectivamente, entretanto, Schwartz et al (1998) afirmam 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 estatisticamente similares ($p>0,05$) para os grupos 0h (64,9%) e 3h (56,2%), porém houve uma redução destas taxas ($p<0,05$) nos grupos transportados por 6h (45,8%), 9h (47,1%) e 12h (44,0%), que foram semelhantes entre si (Tabela 1). Resultados superiores 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 no banho-maria, obtendo taxa de clivagem de 84,3% e 82,0% para o sistema do banho-maria e grupo controle, respectivamente. As taxas de clivagem destes autores assemelham-se as taxas de Leivas et al. (2004), que ao submeterem oócitos ao transporte simulado por 6, 12 e 18h em meio de maturação TCM (Sais de Earle's) + 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 expirado dos pulmões em comparação ao SIC, e a utilização de diferentes meios de cultivo (SOF e CR₂), não observaram diferença estatística entre os sistemas quanto às taxas de clivagem, independente dos meios de cultivo utilizados (SOF: 81,7% e 71,0%, respectivamente; CR₂: 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.

Tratamentos	Oócitos	% Clivagem	% Blastocistos
	N	Dia 3	Dia 7
0h	129	64,9 ± 3,3 ^a	38,0 ± 5,8 ^a
Transporte 3h	132	56,2 ± 7,9 ^{ac}	32,3 ± 7,9 ^{abc}
Transporte 6h	128	45,8 ± 10,7 ^{bd}	27,3 ± 4,9 ^{bc}
Transporte 9h	130	47,1 ± 6,8 ^{cbd}	24,8 ± 6,2 ^{cd}
Transporte 12h	130	44,0 ± 9,1 ^d	18,9 ± 3,8 ^d

^{abcd} letras diferentes, na mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05)

No experimento I, as taxas de blastocistos encontradas para os grupos 0h, 3h, 6h e 9h foram de 38,0%, 32,3%, 27,3% e 24,8%, respectivamente, que assemelham-se as 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 à eficiência do SIBC e 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 superiores 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) utilizando estufa de CO₂ portátil, obtiveram taxa de blastocisto inferior (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, não foram estatisticamente diferentes (p>0,05) para grupos 0h (38,0%) e 3h (32,3%), porém houve uma redução nestas taxas (p<0,05) nos grupos 6h (27,3%), 9h (24,8%) e 12h (18,9%), no entanto, as taxas de blastocistos assemelham-se estatisticamente entre os grupos 3h, 6h e 9h (Tabela 1).

Wrenzycki et al. (2004) e Rizos et al (2002a) citam em seus trabalhos que a taxa máxima obtida de blastocisto bovino está em torno de 30-40%, no entanto Leivas et al. (2004) afirmam 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 boas taxas de blastocistos. Lehmkuhl et al. (2000) afirmam que o transporte de oócitos bovinos em líquido folicular bovino produziram 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 2, 4 e 6h, respectivamente. Portanto, se consideradas estas 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 9h.

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's), 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, ideal para ser utilizado no transporte-maturação de oócitos sem controle da atmosfera gasosa.

Twagiramungu et al. (1998) quando estudaram o transporte de oócitos por 6h em meios TCM-199 (Sais de Earle's) e TCM-199 (Sais de Earle's) + Hepes, obtiveram taxas de blastocistos de 25,0% e 26,0%, resultados estes semelhantes a do presente trabalho, quando se realizou o transporte por 6h em meio TCM-199 (Sais de Earle's) + Bicarbonato + Hepes, e obteve-se taxa de blastocisto de 27,3%. Entretanto, Alm et al. (2008) estudando o efeito da manutenção de oócitos bovinos em uma mistura contendo 40% de TCM 199 (Sais de Earle's) + 40% de TCM 199 (Sais de Hanks) + 20% de SFB, em temperatura ambiente por períodos de 16 a 18h, observaram que os oócitos mantidos na mistura tiveram menor taxa de blastocisto (16,5%) quando comparados ao grupo controle (29,3%), demonstrando que a

manutenção dos oócitos na mistura, nos tempos e na temperatura citados acima, afeta significativamente sua 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 2, 4 e 6h, respectivamente, em líquido folicular bovino, sendo os resultados de 6h semelhantes aos encontrados no presente estudo (27,3%) para o mesmo tempo, no entanto utilizando 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 6h em líquido folicular bovino e equino, respectivamente. Entretanto, Cordeiro et al. (2006) utilizando 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 6h, obtiveram taxas superiores de blastocistos de 49,4% e 49,7%, respectivamente.

No experimento II, as taxas de clivagem foram estatisticamente similares ($p>0,05$) para os oócitos dos grupos 0h (71,4%) e 3h com hormônios (70,3%), porém houve uma redução destas taxas ($p<0,05$) nos grupos 3h sem hormônios (64,8%), 6h com (56,0%) e sem (54,1%) hormônios (Tabela 2). Comparando-se os grupos 3h com (70,3%) e sem (64,8%) hormônios, e os grupos 6h com (56,0%) e sem (54,1%) hormônios, observou-se que estes são diferentes estatisticamente entre si, necessitando a adição de hormônios no meio de transporte-maturação para aumentar os índices de clivagem. Resultados superiores foram obtidos por Figueiró et al. (2004) quando avaliaram a influência da adição de LH e FSH no meio de transporte de oócitos bovinos utilizando o SVE e o SE, e observaram que a utilização do SE com ou sem a adição de hormônios rendeu uma taxa de clivagem de 80%, estatisticamente superior as do grupo SVE com (72%) e sem (61%) a adição de hormônios, respectivamente.

No experimento II, as taxas de blastocistos foram estatisticamente similares ($p>0,05$) para os oócitos dos grupos 0h (46,1%) e 3h com hormônios (45,8%), porém houve uma redução destas taxas ($p<0,05$) nos grupos 3h sem hormônios (41,1%), 6h com (35,5%) e sem (33,5%) hormônios (Tabela 2). Comparando-se os grupos 3h com (45,8%) e sem (41,1%) hormônios, e os grupos 6h com (35,5%) e sem (33,5%) hormônios, observou-se que estatisticamente são diferentes entre si, e que a adição de hormônios no meio de transporte-maturação aumenta a produção de blastocistos, apesar das médias obtidas

estarem, para os grupos sem hormônios, dentro da média de 30-40%, considerada máxima por alguns autores como Wrenzycki et al. (2004) e Rizos et al (2002a), por este motivo, nos respectivos períodos de tempo, os hormônios podem ou não ser adicionados. Resultados inferiores foram obtidos por Figueiró et al. (2004) quando avaliaram a influência da adição de LH e FSH no meio de transporte-maturação de oócitos utilizando o SVE e o SE, e observaram taxas de blastocistos de 27%, 28%, 32% e 20% para os grupos com SVE + hormônios, SE + hormônios, SE e SVE, respectivamente, afirmando que quando se utiliza o SVE é necessária à 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.

Tratamentos	Oócitos	% Clivagem	% Blastocistos
	N	Dia 3	Dia 7
0h	68	71,4 ± 10,7 ^a	46,1 ± 3,1 ^a
Transporte 3h	70	70,3 ± 10,4 ^a	45,8 ± 2,8 ^a
Com hormônios			
Transporte 3h	68	64,8 ± 6,5 ^b	41,1 ± 4,8 ^b
Sem hormônios			
Transporte 6h	68	56,0 ± 7,9 ^c	35,5 ± 5,9 ^c
Com hormônios			
Transporte 3h	66	54,1 ± 15,0 ^d	33,5 ± 4,0 ^d
Sem hormônios			

^{abcd} letras diferentes, na mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05)

6 - CONCLUSÃO

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 9 horas, sem prejuízo do desenvolvimento embrionário *in vitro*.

A adição de hormônios no meio de transporte-maturação de oócitos bovinos promoveu aumento nos índices de blastocistos.

Esta técnica constitui-se em uma alternativa prática e eficiente para a remessa até o laboratório de PIVE, dos oócitos bovinos aspirados a campo.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADONA, P.R.; PIRES, P.R.L.; QUETGLAS, M.D.; SCHWARZ, K.R.L.; LEAL, C.L.V. Nuclear maturation kinetics and *in vitro* embryo development of cattle oocytes prematured with butyrolactone I combined or not combined with roscovitine. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.389-97, 2008.

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. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.2, p.390-396, 2002.

ALM, H. 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.

ALVARENGA, M.A. A excelência do Brasil em embriões. **Informativo Bimestral da Tortuga Cia Zootécnica Agrária**, n.439, ano 49, p.3, 2003.

ALVES, D.F. et al. Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-Hepes. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v.40, p.279-286, 2003.

ALVES, D.F. **Transporte e maturação *in vitro* de oócitos bovinos**. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria. 47p., 2003.

BEVERS, M.M. et al. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v.47, n.1, p.13-22, 1997.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L.A.; SIRARD, S.M. *In vitro* production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, v.47, n.5, p.1061-1075, 1997.

BODART, J.F.L. et al., Characterization of MPF and MAPK activities during meiotic maturation of *Xenopus tropicalis* oocytes. **Development Biology**, v.245, p. 348-361, 2002.

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

BRUM, D.S. et al. Cultivo individual de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.28, p.36-50, 2000.

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.C.; EPPIG, J.J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v.43, p.543-547, 1990.

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 CO₂. **Theriogenology**, v.43, p.179, 1995.

CAMARGO, L.S.A. et al. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction**, v.3, p.19-28, 2006.

CAN, A. SEMIZ, O.; CINAR, O. Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in Mouse oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v.9, p. 749-756, 2003.

CARVALHO, C.M.E. et al. Cultivo *in vitro* de embriões bovinos em um sistema de incubação de baixo custo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, 2007, Suplemento 3.

CORDEIRO, M.S. **Uso da água de coco (Cocos nucifera) como meio de manutenção de oócitos bovinos imaturos para produção *in vitro* de embriões**. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil, 45p., 2006.

CRAIG, J. et al.. Gonadotropin and intra-ovarian signals regulating follicle development and atresia: the delicate balance between life and death. **Front Biosciencie**, v.12, p.3628-3639, 2007.

CRAN, D.G.; ESPER, C.R. Cortical granules and cortical reaction in mammals. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.4,p.177-178, 1990.

CUOMO, A.; DI CRISTO, C.; DI COSMO, A.; PAOLUCCI, M.; TOSTI, E. Calcium currents correlate with oocyte maturation during the reproductive cycle in *Octopus vulgaris*. **J Exp Zool A**, v.303, p.193-202, 2005.

DE FELICI, M.; SALUSTRI, A.; SIRACUSA, G. Spontaneous hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during *in vitro* culture. II. The effect of follicular fluid and glycosaminoglycans. **Gamete Research**, v.12, p.227-235, 1985.

DE SOUZA, P.A. et al. Oogenic and zygotic gene expression directing early bovine embryogenesis: a review. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p.112-121, 1998.

DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.234, p.19-25, 2005.

DIELEMAN, S.J. et al. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of preimplantation embryos. **Theriogenology**, v.57, p.5-20, 2002.

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, n.1, p.340, 2003.

DONG, Y.J. et al. Improvement of the culture conditions for *in vitro* production of cattle embryos in a portable CO₂ Incubator. **Reproduction Domestic Animal**, v.36, p.313-318, 2001.

DUCIBELLA, T. et al. Quantitative Studies of Changes in Cortical Granule Number and Distribution in the Mouse Oocyte During Meiotic Maturation. **Development Biology**, v.130, p.184-197, 1988.

EMANUELLI, I.P. et al. Líquido folicular na inibição da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.28, n.1, p.246, 2000.

FERREIRA, E.M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v.xx, p.xxx-xxx, 2008.

FIGUEIRÓ, G.M. 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. **Ciência Rural**, v.34, p. 479-484, 2004.

FIGUEIRÓ, G.M. et al. Soro equino na PIVE de embriões bovinos: I. Uma análise do soro de égua em diferentes estágios do cio. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.28, n.1, p.258, 2000.

FINDLAY, J.K. et al. Ovarian physiology: follicle development, oocyte and hormone relationships. **Animal Reproduction**, v.6, n.1, p.16-19, 2009.

FRY, R.C.; KELLY, J.M.; HARRIS, S.G.; EARL, C.R. 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.

GALLI, C. et al. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v. 55, p.1341-1357, 2001.

GARCIA, J.M. Produção *in vitro* de embriões bovinos: diferentes procedimentos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.26, p.280, 1998, Suplemento.

GILBERT, S.F. **Developmental Biology**. Sunderland, MA: Sinauer Associates Ltd., p. 585-617, 2000.

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, University Press, 1994, 640p.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reproduction in Farm Animals**. 7. ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, 509p.

HAKE, L.E.; RICHTER, J.D. Translational regulation of maternal mRNA. **Biochemical and Biophysical Acta**, v.1332, p.M31-M38, 1997.

HASHIMOTO, S.; KIMURA, K.; HISATAKA, I.; TAKAKURA, R. Oocyte transport: Developmental competence of Bovine oocytes arrested at Germinal Vesicle Stage by Cycloheximide under Air. **Journal of Reproduction and Development**, v.49, n.1, p.61-66, 2003.

HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; TAKAKURA, R.; IMAI, H. Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest in vitro. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1696-701, 2002.

HUMBLOT, P. et al. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.63, p.1149-1166, 2005.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.

KAISER, G. et al. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em criotubos e em estufa portátil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.27, p.241, 1999. Suplemento.

KELLER, M.L.; OLSON, S.E.; SEIDEL Jr., G.E. Storage of bovine oocytes in calcium-free medium for 1 hour markedly lowers *in vitro* fertilization and embryonic development. **Theriogenology**, v.39, n.1, p.243, 1993.

KURTZ FILHO, M. **Maturação e fecundação de oócitos bovinos mantidos em banho-maria**. Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 67p., 2003.

LANDIM-ALVARENGA, F.C. et al. **Animal Reproduction Science**, v.71, p. 181-191, 2002.

LANUZA, G.M.; FICHIMAN, M.L.; BARAÑAO, J.L. Growth promoting activity oocytes on granulose cells is decreased upon meiotic maturation. **Developmental Biology**, v.197, p.129-139, 1998.

LEDAN, E. et al. Meiotic maturation of the mouse oocyte requires equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. **Development Biology**, v.232, p.400-413, 2001.

LEHMKUHL R.C. **Desenvolvimento de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular**. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 16p., 2001.

LEHMKUHL R.C. et al. Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular e submetidos a FIV. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.28, p.276, 2000, Suplemento.

LEIVAS, F.G. et al. Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos mantidos em meio de maturação não gaseificado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, p.414-415, 2001.

LEIVAS, F.G. et al. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação sem controle de atmosfera gasosa. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.219-224, 2004.

LEIVAS, F.G. **Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação sem controle de atmosfera gasosa**. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, 40p., 2002.

LONERGAN, P. et al. Effect of follicle size on bovine oocytes quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, p.48-53, 1994.

LONERGAN, P.; FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos - Dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, p.17-22, 2008.

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.333-46, 2003.

MASUI, Y. A quest for cytoplasmic factors that control the cell cycle. **Cell Cycle Research**, v.2, p.1-13, 1996.

MATTIOLI, M.; BARBONI, B. Signal transduction mechanism for LH in the cumulus-oocyte complex. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2000.

MAYES, M.; SIRARD, M.D. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**, v.55, p.911-922, 2001.

MEIRELLES, F.V. et al. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v.82, p.3-20, 2004.

MEYES, M. **The meiotic arrest of bovine oocytes**. Tese de Doutorado apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Université Laval, Canadá, 2002.

MEZZALIRA, A. et al. Transporte de embriões bovinos fecundados *in vitro*. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.26, p.312, 1998.

MIRANDA, M.S. **Avaliação de um sistema de cultivo de baixo custo na produção *in vitro* de embriões**. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil, 2004.

MIRANDA, M.S.; CARVALHO, C.M.F.; CORDEIRO, M.S.; SANTOS, S.S.D.; OHASHI, O. M. Sistemas alternativos de incubação e meios de cultivo para produção *in vitro* de embrião bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.218-223, 2007.

MONIAUX, D. et al. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. **Journal Reproductive Fertility Supplement**, v.51, p.3-23, 1997.

MONTAGNER, M.M. et al. Hepes na produção de embriões bovinos *in vitro*. **Ciência Rural**, v.30, n.3, p.469-474, 2000.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y.; OLIVEIRA, L.F.; TEIXEIRA, M.D. Utilização da água de coco e suas frações ativas na conservação *in vitro* do sêmen na espécie caprina. **Ciência Animal**, v.2, p.32-43, 1996.

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.; BREM, G. *In vitro* development and viability of bovine embryos produced without gassed incubator. **Theriogenology**, v.49, p.213, 1998.

PAVLOK, A. et al. Storage of bovine isolated follicles: A new alternative way to improve the recovery rate of viable embryos from ovarian follicles of slaughtered cows. **Animal Reproduction Science**, v.96, p. 186–195, 2006.

PAZ, P. et al. Ultrastructural and cytochemical comparison between calf and cow oocytes. **Theriogenology**, v.55, n.5, p.1107-1116, 2001.

PIERCE, K.E. et al. Characterization and localization of mouse egg cortical granule antigen prior to and following fertilization or egg activating. **Development Biology**, v.141, p.381-392, 1990.

PINCTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular Cellular Endocrinology**, v.145, p.27–37, 1998.

PINTO, M.G.L. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos após a manutenção dos oócitos em líquido folicular eqüino ou bovino. **Archives of Veterinary Science**, v.7, n.2, p.115-120, 2002.

QUETGLAS, M.D. **Efeito do bloqueio meiótico na expressão, atividade e distribuição do Fator Promotor da Meiose (MPF) e da Proteína Cinase Ativada por Mitógenos (MAPK) em oócitos bovinos.** Tese de Doutorado apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 90p., 2007.

RAUBER, L.P. **Líquido folicular bovino na produção *in vitro* de embriões bovinos.** Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 46p., 2003.

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.

RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOPOULOS, S.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Developmental, qualitative and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.62, p.320-327, 2002a.

ROCHA, A. et al. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* But Not in *Bos indicus* Cows. **Theriogenology**, v.49, n.3, p.657-665, 1998.

RODOVALHO, N.C.M. et al. Proteoma do líquido folicular bovino em função do tamanho folicular. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.28, n.1, p.322, 2000.

RODRIGUEZ, K.F.; FARIN, C.E. Developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes after transcriptional inhibition of germinal vesicle breakdown. **Theriogenology**, v.61, p.1499-1511, 2004.

ROSE, T.A.; BAVISTER, B.D. Effect of oocyte maturation medium on in vitro developmental of in vitro fertilized bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.31, p.72-77, 1992.

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibl Anatomy**, v.24, p.77, 1983.

SAUMANDE, J. Ovogènese et Folliculogènese. **Rec. Méd. Vét.**, v.157, p.29-38, 1981.

SAWYER, H.T. et al. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. **Biology of Reproduction**, v. 66, p.1134-50, 2002.

SCHERTHANER, W. et al. Storage of bovine oocytes after ultrasound guided follicle aspiration: Effects on developmental competence. In: REUNION OF ASSOCIATION EUROPEENNE DE TRANSFERT EMBRYONNAIRE, XIV, Venice, **Proceedings...**, p.242, 1998.

SCHNEIDER, M.R. et al. Short-term storage of *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.49, n.1, p.249, 1998.

SCHWARTZ, J.; SCHNEIDER, M.R.; RODRIGUES, J.L.; REICHENBACH, H-D. Effect of short-term storage of bovine oocytes in different media and temperatures on the subsequent *in vitro* embryo development. **Theriogenology**, v.49, n.1, p.217, 1998.

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**, 2. ed., USA: Cadmus Professional Communications, 1999, 368 p.

SHEN, P.C. et al. The effect of activation treatments on the development of reconstructed bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.106, p. 1-12, 2008.

SHI, D.S.; AVERY, B.; GREVE T. Effects of temperature on *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.50, p.667-674, 1998.

SILVA, I.O. **Inibição e reversão da maturação nuclear, avaliação da maturação citoplasmática e produção de esteróides em complexos *cumulus oophorus* bovinos co-cultivados com hemiseções foliculares em meio de cultura definido**. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília – Faculdade de Medicina, Brasília, DF, Brasil, 84p., 2008.

SIRARD, M.A.; COENEN, K. Effects of inhibition of meiotic resumption upon the subsequent development of bovine oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Development**, v.41, p.255-262, 1994.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.126-136, 2006.

STRINGFELLOW, D.A. et al. Quality controls for bovine viral diarrhea virus-free IVF embryos. **Theriogenology**, v.53, p.827-839, 2000.

SUN, Q.Y.; FUCHIMOTO, D.; NAGAI, T. Regulatory roles of ubiquitin-proteasome pathway in pig oocyte meiotic maturation and fertilization. **Theriogenology**, v.62, p.245-255, 2004.

SUZUKI, T.; SUMANTRI, C.; KHAN, N.H.A.; MURAKAMI, M.; SAHA, S. Development of a simple, portable carbon dioxide incubator for production of bovine IVF embryos. **Theriogenology**, v.43, p.330, 1997.

SWENSON, M.J.; REECE, W.O. Dukes' **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, 856p.

TESSMANN, J.V. **Transporte–Maturação de oócitos bovinos em palhetas**. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), Santa Maria, RS, Brasil, 2004.

TOSTI, E. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.4, p.26, 2006.

TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; GUILBAULT, L.A.; SIRARD, M.A.; BOUSQUET, D. Media and time of oocytes transport influence their developmental competence for *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.49, n.1, p.299, 1998.

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. The submarine incubation system, a new tool for *in vitro* embryo culture a technique report. **Theriogenology**, v. 48, p.1379-1385, 1997.

VAN DEN HURK, R.A.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717-1751, 2005.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M. Ovum Pick Up and In Vitro Production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. **Theriogenology**, v.65, p.914-925, 2006.

VIZCARRA, V.E.L. et al. Efeito do fluído folicular na manutenção de oócitos recém aspirados de bovinos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.28, p.343, 2000, Suplemento.

VORONINA, E; WESSEL G.M. The regulation of oocyte maturation. **Current Top Development Biology**, v.58, p.53-110, 2003.

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. et al. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biology of Reproduction**, v.62, p.355-364, 2000.

WEHREND; A.; MEINECKE, B. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP Kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. **Animal Reproduction Science**, v.66, p.175-184, 2001.

WESSEL, G.M. et al. The biology of cortical granules. **International Journal of Cytology**, v.209, p.117-206, 2001.

WOLF, E. et al. Recent progress in the *in vitro* production and cloning of bovine embryos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.26, n.1, p.161-177, 1998.

WRENZYCKI, C.D. et al. Gene expression patterns in in vitro-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.593-603, 2004.

YANG, N.S.; LU, K.H.; GORDON, I. *In vitro* fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. **Theriogenology**, v.33, p.352, 1990.

YI, Y.J.; PARK, C.S. Parthenogenetic development of porcine oocytes treated by ethanol, cycloheximide, cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine. **Animal Reproduction Science**, v.86, p.297-304, 2005.

A N E X O S I

MEIO DE LAVAGEM DOS OÓCITOS (H199)

Componentes	10 mL
TCM 199 Hepes	9 mL
Soro Fetal Bovino	1 mL
Piruvato	20 µL
Gentamicina	50 µL

MEIO DE TRANSPORTE- MATURAÇÃO DOS OÓCITOS (MTM)

Componentes	20 mL
TCM 199 Bicarbonato	18 mL
Bicarbonato	0,001 g
Hepes	0,119 g
SFB	2 MI
Piruvato	40 µL
Gentamicina	100 µL
FSH	20 µL
LH	200 µL
Estradiol	20 µL

MEIO DE TRANSPORTE- MATURAÇÃO DOS OÓCITOS (MTM I)

Componentes	20 mL
TCM 199 Bicarbonato	18 mL
Bicarbonato	0,001 g
Hepes	0,119 g
SFB	2 mL
Piruvato	40 µL
Gentamicina	100 µL

MEIO DE MATURAÇÃO DOS OÓCITOS (B199)

Componentes	10 mL
TCM 199 Bicarbonato	9 mL
Bicarbonato	0,022 g
Hepes	0,059 g
SFB	1 mL
Piruvato	20 µL
Gentamicina	50 µL
FSH	10 µL
LH	100 µL
Estradiol	10 µL

MEIO TL-STOCK

Componentes	25 mL
Na Cl	0,166 g
KCl	0,006 g
MgCl ₂ .6 H ₂ O	0,002 g
NaH ₂ PO ₄	0,00117 g
NaHCO ₃	0,0525 g
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0,0075 g
Ácido Láctico	35,7 µL
Vermelho	0,0003 g
Fenol	
H ₂ O Milli-Q	25 mL
(q.s.p.)	

MEIO FIV

Componentes	4 mL
ALP Stock	3,6 mL
BSA	0,024 g
Piruvato	8 µL
Gentamicina	20 µL
PHE	160 µL
Heparina	40 µL

ANEXOS II

MEIO TL-SÊMEN	
Componentes	25 mL
Na Cl	0,145 g
KCl	0,00575 g
MgCl ₂ .6 H ₂ O	0,002 g
NaH ₂ PO ₄	0,0010 g
NaHCO ₃	0,0525 g
CaCl ₂ .2 H ₂ O	0,0075 g
Ácido Láctico	77,5 µL
Vermelho	0,0003 g
Fenol	0,0003 g
Hepes Ácido	0,0595 g
H ₂ O Milli-Q	25 mL
(q.s.p.)	

PERCOLL		
	90%	45%
Componentes	4 mL	1 Tubo
Percoll	3600 µL	-
Solução 10 X	400 µL	-
CaCl ₂	8 µL	-
MgCl ₂	15,6 µL	-
Ácido Láctico	14,8 µL	-
NaHCO ₃	0,0084 g	-
Percoll 90%	-	1 mL
TALP Stock	-	1 mL

MEIO SOF	A	B	C	D	L-
Soluções Estoque	Sais	Bicarbonato	Piruvato	CaCl ₂	Glutamina
Água Milli-Q	9,84 mL	10 MI	1mL	1mL	1MI
NaCl	0,629 g	-	-	-	-
KCl	0,0534 g	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄	0,0162 g	-	-	-	-
MgSO ₄ -7H ₂ O	0,0182 g	-	-	-	-
DL-Ácido Láctico	60 µL	-	-	-	-
Bicarbonato de Sódio	-	0,210 g	-	-	-
<i>Phenol Red</i>	-	0,001 g	-	-	-
Piruvato Sódico	-	-	0,011 g	-	-
CaCl ₂ -2H ₂ O	-	-	-	0,0262 g	-
L-Glutamina	-	-	-	-	0,02923 g

MEIO SOF ESTOQUE	10 mL
Água Milli-Q	7,8mL
Estoque A	1mL
Estoque B	1mL
Estoque D	100µL
L-Glutamina	10µL
BME Essenciais (50X)	100µL
MEM Não-Essenciais (100X)	100µL
Myo-Inositol	0,005g
Tri-Citrato de Sódio	0,001g

MEIO SOF FINAL	5 mL
SOF estoque	5mL
Estoque C	10µL
Kanamicina	25µL
BSA	0,025g
SFB	125µL