

AURELINO MENARIM JÚNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE INCUBADORA PORTÁTIL PARA
A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Patologia
da Reprodução, Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias da Universidade Federal
do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss

CURITIBA
2002



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do Candidato ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária **AURELINO MENARIM JÚNIOR** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

- 1) A Tese, intitulada “**Desenvolvimento de Incubadora Portátil para a Maturação in Vitro de Ovócitos Bovinos**” foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) O Candidato se houve muito bem durante a Defesa de Dissertação, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pelo Candidato, atribuiu o conceito “C” concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária.

Curitiba, 04 de março de 2002.


Prof. Dr. ROMILDO ROMUALDO WEISS
Presidente/Orientador


Prof. Dr. RÜDIGER DANIEL OELHOFF
Membro


Prof. Dr. LUIZ ERNANDES KOZICKI
Membro

AGRADECIMENTOS

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e divulgação deste trabalho, em especial;

Ao Professor e Orientador Dr. Romildo Romualdo Weiss

Pelo acompanhamento e revisão do estudo

Ao Dr. José Kazumassa Tahíra (Co-orientador)

Pelo grande incentivo e auxílio nos trabalhos

Aos técnicos:

Afonso, Elisa, Jamile e Catarina, sem os quais teria sido impossível concluir o trabalho, minha eterna gratidão.

Meus agradecimentos ao estatístico Carlos Ramos.

À minha esposa Tereza e aos meus filhos Débora, Sandra, Sérgio, Larissa e Rodrigo, o mais profundo Amor pela compreensão e apoio.

Seja como o fole da forja, que é quando
Se esvazia que produz energia.

(Lao Tsé)

Só a sabedoria pode dar ao homem uma
resposta de paz.

(Seger)

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	v
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i>	4
2.2 FOLICULOGÊNESE	5
2.3 MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	8
2.4 PROCESSO NATURAL DE MATURAÇÃO	8
2.5 EVENTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS NA MATURAÇÃO	11
2.6 MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> (MIV)	12
2.7 MEIOS DE CULTURA	12
2.8 QUALIDADE DE FOLÍCULOS E OÓCITOS	14
2.8.1 Atresia Folicular	14
2.8.2 Morfologia dos Oócitos	15
2.8.3 Efeito do Tempo de Maturação	15
2.8.4 Efeito da Temperatura da MIV	16
2.8.5 Uso do Óleo Mineral	17
2.8.6 Uso do Soro Bovino nos Meios de Maturação	17
2.8.7 Efeito do Gás Atmosfera	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 COLHEITA DE OVÁRIO NO MATADOURO	20
3.2 PROCEDIMENTOS PARA A ASPIRAÇÃO DOS OÓCITOS	20
3.3 PESQUISA E CLASSIFICAÇÃO DE OÓCITOS	22
3.4 DESCRIÇÃO DA INCUBADORA DE CO ₂ PORTÁTIL	24
3.5 MATURAÇÃO DOS OÓCITOS	27
4 RESULTADOS	30
4.1 ANÁLISE DOS RESULTADOS	31
4.1.1 Teste para o total de observações	31
5 DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÕES	35
7 REFERÊNCIAS	36

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01 – Ovários transportados em garrafa térmica ao laboratório	20
FIGURA 02 - Lavagem dos oócitos no laboratório.....	21
FIGURA 03 - Aspiração de oócitos de folículos de 2 a 8 mm	22
FIGURA 04 - Classificação morfológica de oócitos bovinos colhidos de ovários de fêmeas abatidas	23
FIGURA 05 - Gotas contendo meios (tcm-199) para maturação de oócitos.....	24
FIGURA 06 - Incubadora de CO_2 portátil	25
FIGURA 06.1 - Incubadora de CO_2 portátil	25
FIGURA 07 - Mangueira conectada à cuba	26
FIGURA 08 - Gotas contendo oócito na placa de Petri.....	26
FIGURA 09 - Injeção de água destilada para a liberação de CO_2	28
FIGURA 10 - Presença do corpúsculo polar no oócito maturado <i>in vitro</i>	28
FIGURA 10.1 - Presença do corpúsculo polar no oócito maturado <i>in vitro</i>	29
TABELA 01 - Efeitos de diferentes quantidades de sais efervescentes (gramas/litro) na concentração de CO_2 para desenvolvimento dos oócitos bovinos em uma incubadora portátil	30
TABELA 02 – Teste qui-quadrado dos resultados	32
GRÁFICO 01 - Comparação gráfica de oócitos com presença (cpp) e ausência (cpa) de corpúsculo polar em diferentes concentrações de CO_2	31

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

Abreviações

COC	-	Complexo cúmulos oócito
Eij's	-	Número de casos esperados classificados na linha i coluna j
FCS	-	Soro fetal bovino
FIV	-	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	-	Hormônio Folículo Estimulante
GE	-	Grânulos Efervescentes
GVBD	-	Quebra de vesícula germinativa
IA	-	Inseminação Artificial
IMO	-	Inibidor da maturação de oócitos
IVC	-	Cultura <i>in vitro</i>
LH	-	Hormônio Luteinizante
MAS	-	Esteróide ativador de meiose
MIV	-	Maturação <i>in vitro</i>
OCS	-	Soro de vaca em estro
Oij's	-	Número de casos observados classificados na linha i e coluna j
OPU	-	Aspiração folicular guiada por ultra-som
PBS	-	Solução salina fosfatada
PIV	-	Produção <i>in vitro</i>
SPE	-	Soro de vaca em pró-estro
SSV	-	Soro de vaca super ovuladas
TE	-	Transferência de embrião
VG	-	Vesícula Germinativa
VNE	-	Vacas não estimuladas
VSO	-	Vacas super ovuladas

Siglas

IAPAR – Instituto Agrônômico do Paraná

RESUMO

O objetivo deste estudo foi desenvolver e avaliar uma incubadora simples e portátil, com capacidade de 600 ml, utilizando-se sais efervescentes para produzir diferentes atmosferas e concentrações de CO₂ na maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Para conseguir as diferentes concentrações, utilizou-se sais compostos (bicarbonato de sódio-2.31 grs., ácido cítrico-2.19 grs., carbonato de sódio-0.50 grs.), e injetou-se água destilada dentro da cuba após estar completamente fechada. As concentrações de dióxido de carbono de 2%, 5%, 7% e 10%, foram conseguidas com as quantidades de 0.138, 0.345, 0.477 e 0.691 grs. Dos sais, respectivamente. Os oócitos foram colhidos através da aspiração de folículos de ovários provenientes de vacas de abatedouro. A taxa de maturação foi avaliada através da presença do corpúsculo polar após 20 horas de incubação. Os resultados obtidos foram de 69,1%; 53,6%; 55,8%; 60,1%; para 2%, 5%, 7%, e 10% de CO₂, respectivamente. Estes resultados demonstraram que a concentração de 2% de CO₂ (0,138 g/l de sais efervescente) foi mais eficiente para a maturação *in vitro* de oócitos bovinos numa incubadora portátil, havendo ainda a necessidade de estudo para avaliar a concentração de O₂, bem como, testar diferentes concentrações de CO₂ na fertilização e cultura *in vitro* de oócitos bovinos.

ABSTRACT

The objective of the study was to develop and evaluate a simple and portable 600 ml chamber for *in vivo* maturation of bovine oocytes using effervescent granules to achieve different concentrations of carbon dioxide (CO₂). To achieve the desired CO₂ concentration, the dry effervescent compound (sodium bicarbonate – 2.31 g; citric acid – 2.19 g and sodium carbonate – 0.50g) was put in the chamber and distilled water was poured over it after the chamber was sealed. Carbon dioxide concentrations of 2.0%, 5.0%, 7.0% and 10.0% were obtained using, respectively, 0.138, 0.345, 0.477 and 0.691 g of the effervescent compound. Oocytes were harvested through aspiration of ovarian follicles from slaughtered cows and were incubated in the chamber using different concentrations of CO₂. The maturation level was evaluated by the presence of a polar body after 20 h of incubation. Maturation levels of 69.1%, 53.6%, 55.8% and 60.1% were obtained for a CO₂ concentration of 2.0%, 5.0%, 7.0% and 10.0%, respectively. It was concluded that a concentration of 2.0% CO₂ was the most efficient of *in vivo* maturation of bovine oocytes. However, more studies are necessary to evaluate the role of O₂ concentration on the process and to test additional CO₂ levels in on in vitro fertilization and culture of bovine oocytes .

1 INTRODUÇÃO

Os enormes desafios representados pelo melhoramento genético e o aumento de produtividade do rebanho bovino brasileiro, nos últimos 40 anos, tiveram como principal alavanca, a utilização de biotecnologias de multiplicação animal, em diferentes fases do seu desenvolvimento e aplicação. O marco inicial foi sem dúvida a implantação da inseminação artificial (I.A.) e o desenvolvimento da técnica de congelamento do sêmen bovino. Estava resolvida a fase da multiplicação dos poucos, mas excelentes touros, especialmente os da Raça Nelore. Todavia, também as fêmeas de alta qualidade genética necessitavam ser multiplicadas. Assim prosperaram as biotecnologias de controle do ciclo estral, superovulação e transferência de embriões (T.E.). Mas, todas estas novas biotecnologias criaram a necessidade de um melhor monitoramento da atividade ovariana, e promoveram o desenvolvimento de técnicas de ultra-sonografia.

Na seqüência foram desenvolvidos estudos sobre maturação e fertilização de oócitos bovinos, em laboratório, coletados de animais destinados ao abate. A próxima etapa desenvolvida foi a técnica de aspiração folicular em ovários, com auxílio de sonda monitorada por ultra-som (OPU), o que permitiu o uso de animais vivos.

Poucos anos se passaram até o completo domínio da nova biotecnologia, porém as grandes distâncias de um país continental como o nosso, dificultam a

remessa de óocitos para os laboratórios de fertilização *in vitro*. O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de incubadora portátil, que permita manter em condições normais de maturação, óocitos remetidos de qualquer ponto do país, para o laboratório responsável pela fertilização e produção de embriões *in vitro* (P.I.V.).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

A fertilização *in vitro* consiste na obtenção de oócitos, a partir de vacas vivas ou mortas, que serão maturados, fertilizados e cultivados no laboratório, até que o embrião se desenvolva ao estágio mórula ou blastocisto, estágios recomendados para a transferência às receptoras.

Em bovinos, os folículos são formados antes do nascimento da fêmea, sendo encontrados ao nascimento reserva de 120.000 a 150.000 folículos primordiais ou primários, 200 a 500 folículos em crescimento, e 20 a 50 folículos antrais. Os folículos pré-antrais, ou seja, os folículos primordiais, primários e em crescimento, representam 99% da reserva de germoplasma (ERICKSON, 1966). Porém, a grande maioria desses, não são aproveitados, pois se tornam atrésicos. Analisando dessa forma, verifica-se o grande potencial de produção que esses animais possuem, e que pode ser muito melhor aproveitado se técnicas como a fertilização *in vitro* (F.I.V.) forem utilizadas.

Desde o século passado sabia-se que o avanço nos conhecimentos sobre a fertilização em mamíferos, seria mais fácil se o processo fosse observado *in vitro*, e desde então foram iniciados esforços nesse sentido.

Nos anos 30, PINCUS e ENZMANN (1935), trataram os oócitos de coelhas com sêmen e estes foram cultivados. Na mesma época, a partir do tratamento

dos oócitos com sêmen recuperado do oviduto de coelhas, foi possível obter produto após a transferência. Porém, os resultados não foram conclusivos, porque outras possibilidades de fertilização não foram excluídas.

Antes de 1940, a maioria dos conhecimentos era baseada nos estudos com ouriço-do-mar, embora alguns experimentos tenham sido realizados por PINCUS e ENZMANN (1935) citado anteriormente.

Mas foi a partir de 1950, com o reconhecimento do fenômeno da capacitação espermática (AUSTIN, 1951; CHANG,1951), os mecanismos da fertilização em mamíferos foram melhor entendidos. A partir de então foi realizada a primeira demonstração de FIV em coelhas, resultando em nascimento em 1959. O sêmen utilizado foi recuperado do útero de coelhas, 12 horas após o cruzamento. Em 1968, foi realizada a fertilização de oócitos de ratas, com sêmen capacitado *in vivo* com sucesso. Já em 1970, foi desenvolvida a técnica de capacitação espermática *in vitro*, realizada com sêmen recuperado do epidídimo de ratos.

IRITANI e NIWA, (1977) conseguiram algum sucesso com FIV em bovinos. Em 9/6/1981, nasceu o primeiro bezerro produzido através da FIV, como resultado do esforço pioneiro de BRACKETT *et al.* (1982), nos EUA. Em 1987, LU *et al.* obtiveram prenhez bovina produzida totalmente *in vitro*.

Com o uso da FIV, torna-se possível obter vários produtos de vacas de valor genético superior, que por motivos como: idade avançada, fertilidade comprometida, doenças crônicas e/ou graves, entre outras situações, seja indicado o abate. Os ovários dessas vacas são colhidos logo após o abate, e levados ao laboratório, onde os oócitos são colhidos e todo o processo, ou seja, maturação, fertilização e cultura, são desenvolvidas.

Mas também é possível colher oócitos de vacas vivas, e estas colheitas podem ser feitas semanalmente, uma ou duas vezes, o que maximiza ainda mais a produção, e reduz ainda mais os custos, visto que o tratamento hormonal é dispensável e o número de produtos é muito maior. Considerando a obtenção de em média 5 embriões por semana, com índice de 30% de produção de mórulas e blastocistos, ao final de um ano, é possível obter cerca de 72 embriões, que se forem bipartidos, podem resultar em até 72 prenhez.

Na FIV podem ser utilizadas novilhas pré-púberes, vacas em anestro após parto e fêmeas no 1º trimestre de gestação, considerando ainda, a possibilidade da sexagem do sêmen, a fim de produzir o animal que melhor convém ao tipo de produção, pode-se atingir o máximo de sucesso e produtividade na atividade pecuária.

2.2 FOLICULOGÊNESE

O folículo é o compartimento ovariano que habilita o ovário a desempenhar sua dupla função de gametogênese e esteroidogênese.

Durante a vida intra-uterina, é formada uma grande quantidade de folículos primordiais, que são armazenados e começam a crescer continuamente durante a vida, ou pelo menos até a exaustão da reserva. Os fatores que controlam o mecanismo de crescimento folicular não são totalmente conhecidos. A ampliação do oócito se dá em seguida às alterações de forma da célula folicular para cubóide. Quando qualquer folículo é liberado dessa reserva, ele continua a crescer até a ovulação ou até que degenere, como é o caso da maioria. Em geral,

bovinos ovulam um único folículo, que pode ser identificado pelo seu tamanho, ao redor de 3 dias antes do estro. Esse único folículo que chega a ovulação, é considerado dominante e sua presença inibe o desenvolvimento dos folículos menores. Esse fenômeno limita a produção de um número maior de embriões, (HAFEZ, 1995).

O crescimento folicular até a fase de antro não é totalmente dependente de gonadotrofinas. Enquanto, a formação de antro e o crescimento final são totalmente dependentes de FSH e LH. Esse crescimento inclui a produção hormonal e a proliferação e diferenciação das células granulosas e da teca, proporcionando um aumento da habilidade dos folículos produzir estradiol e responder às gonadotrofinas. A produção de estradiol determina aquele folículo que vai receber os receptores de LH necessários à ovulação e luteinização. Qualquer distúrbio na resposta das células granulosas e da teca aos estímulos gonadotróficos, que mantém os padrões máximos da biossíntese de estrógenos e andrógenos, leva ao término do crescimento folicular e ao início da atresia. No entanto, os folículos ovarianos não dependem somente de fatores extracelulares, como as gonadotrofinas, mas também de um sistema complexo de relações intrafoliculares. No antro folicular se acumula um fluido, um transudato sérico modificado, que contém altos níveis de estradiol- 17β na fase folicular, e progesterona à medida que se aproxima a ovulação (HAFEZ, 1995).

Folículos ovarianos viáveis acumulam e secretam esteróides, principalmente estradiol, progesterona e 4-androstenodiona; e vários não esteróides fisiologicamente ativos, como: um inibidor de maturação de oócito (IMO), que não permite que a meiose do mesmo se complete; um inibidor da luteinização, que previne ou inibe a luteinização das células granulosas; um

inibidor do receptor que carrega o FSH, e que deprime a ligação deste com as células granulosas além da relaxina e de uma proteína com atividade de inibina, a qual deprime a secreção de FSH. Por isso, entre as funções do fluido folicular, estão a regulação das funções das células granulosas, início do crescimento folicular, esteroidogênese e conseqüentemente maturação do oócito (HAFEZ, 1995).

A existência do IMO, em algumas ocasiões, apresenta efeitos positivos. Por exemplo, em um programa de FIV, cuja coleta de oócitos é feita a campo, é muito importante que a meiose estacione no estágio de vesícula germinativa (VG), até que o material chegue ao laboratório. Dessa forma, estudos foram realizados, promovendo essa inibição também *in vitro*. LOOS *et al.* (1992) e RICHARD e SIRARD (1993), relataram que oócitos co-cultivados com partes da parede do folículo, permanecem em sua maioria, com a meiose parada, o que nos permite concluir que o fator inibitório é secretado pela parede folicular.

KALOUS *et al.* (1993), demonstraram que a superfície intacta de células granulosas de suínos, previne a retomada da meiose de oócitos bovinos. Resultados de SIRARD e BILODEAU (1990), mostraram que células granulosas vivas são capazes de manter os oócitos no estágio de VG por pelo menos 24 horas. Porém, de acordo com esses trabalhos, as células granulosas em número limitado, não inibem a retomada de meiose, especialmente se o meio de maturação contém soro de vaca em cio ou adição de gonadotrofinas.

2.3 MATURAÇÃO *IN VITRO*.

A maturação *in vitro* foi descrita pela primeira vez por PINCUS e ENZMANN (1935), ao observarem que os oócitos primários de coelhas, reiniciavam a meiose espontaneamente, quando liberados do folículo e cultivados em meio adequado.

Em bovinos, SREENAN (1968), relatou pela primeira vez a maturação de oócitos obtidos a partir de ovários de abatedouros, observando que a maturação nuclear ocorre 24 horas depois do início da cultura.

Alguns trabalhos estimam que cerca de 150.000 folículos primários estão presentes nos ovários das fêmeas ao nascer (ERICKSON, 1966). Sem a aplicação das biotecnologias atuais, poucos desses folículos seriam aproveitados.

2.4 PROCESSO NATURAL DE MATURAÇÃO

No nascimento um número determinado de oócitos estão alocados em cada ovário, estando eles parados na prófase da primeira divisão meiótica. Estes constituem um conjunto de oócitos de folículos primordiais, que permanecerão quiescentes, até que um sinal desconhecido estimule o desenvolvimento de algum deles a cada dia. Os oócitos são circundados por camadas celulares, sendo as células granulosas ligadas à zona pelúcida através de junções. Essas estruturas de comunicações intercelulares são necessárias para sustentar o crescimento acelerado dessa fase.

Durante a fase de crescimento, o oócito seqüestra grandes quantidades de

RNA e ribossomos, que são armazenados e permanecem inativos por longos períodos. O crescimento completa-se quando o oócito torna-se capaz de reiniciar a meiose e alcançar a metáfase II. Para um crescimento regular, é importante e indispensável que, o contato entre as células granulosas e o oócito seja preservado em cultura *in vitro*. No final da fase de crescimento, o oócito não é capaz de ser fertilizado ou de suportar o desenvolvimento embrionário inicial. Neste momento, o oócito é completamente dependente das células somáticas, que providenciam o suporte metabólico e sinais regulatórios para a atividade sintética e nuclear (HAFEZ, 1995).

No estro, altos níveis de liberação de gonadotrofinas, constituem o sinal para células foliculares, a fim de remover o bloqueio meiótico e para induzir uma série de mudanças no núcleo e citoplasma dos oócitos que conduzirão à completa maturação. A maturação dos oócitos, ocorre em folículos preovulatórios, depois da onda preovulatória de LH, simultaneamente ao desenvolvimento desses folículos. Isto inclui a conclusão de dois programas celulares: a maturação nuclear, que corresponde ao início da meiose do estágio de vesícula germinativa para a metáfase II; e a maturação citoplasmática, que consiste em mudanças moleculares e estruturais que permitam ao oócito maturado, suportar a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial, (HAFEZ, 1995).

O processo de maturação nuclear inicia com a quebra da vesícula germinativa, que é comumente denominada GVBD; com o desaparecimento do nucléolo e condensação dos cromossomos. Oócitos de bovinos, ovinos e suínos, que apresentam um grau de maturação relativamente lento, em comparação aos roedores, necessitam de síntese de proteínas ativas, para que a meiose seja reiniciada. Com a ocorrência da GVBD os cromossomos condensam de forma

compacta. O centrossomo então se divide em dois centríolos ao redor das hastes. As hastes se movem e formam um fuso entre elas. Os cromossomos, em pares diplóides, arranjam-se em uma disposição equatorial (metáfase I). O oócito primário sofre duas divisões meióticas. Na primeira divisão, são formadas duas células filhas, sendo que uma delas contém um citoplasma bem maior, e a outra menor, forma o primeiro corpúsculo polar. A progressão da telófase da 1ª divisão para a extrusão do 1º corpúsculo polar, inclui a expulsão de um grupo de cromossomos para o espaço perivitelino, enquanto o outro grupo permanece no citoplasma do oócito. Nessa fase, o oócito já é considerado secundário, e os cromossomos vitelinos reverterem à formação do fuso, ou seja, o segundo fuso meiótico. A segunda divisão meiótica inicia e prepara-se para a metáfase II. Mas esta não se completa antes de ocorrer à penetração espermática ou outra forma de ativação do oócito. A conclusão da 2ª divisão meiótica é acompanhada da extrusão do 2º corpúsculo polar para o espaço vitelínico. Até então, o oócito contém apenas um número haplóide de cromossomos (HAFEZ, 1995).

Na vaca viva, GVBD ocorre 4 a 8 horas depois do pico preovulatório de LH (KRUIP *et al.*, 1983). Em vacas superovuladas, observa-se a ocorrência de GVBD 6 a 12 horas depois do início da maturação (XU *et al.*, 1986). KING *et al.* (1985), sugeriram que a maturação nuclear é mais rápida *in vitro* que *in vivo*. De acordo com LOOS *et al.* (1991), em estudo com vacas não superovuladas, GVBD ocorre em 8 horas e a metáfase II é atingida às 19 horas.

Sabe-se da existência de um fator promotor da maturação, um fator inespecífico, responsável pela transição da fase de vesícula germinativa até a metáfase II. É verdade também que a onda de LH é um fator disparador do reinício da meiose (HAFEZ, 1995).

A liberação do Complexo-cúmulus-oócito (COC) do meio folicular, espontaneamente, induz o reinício da meiose. Esta informação, aliada ao fato de que os oócitos cultivados em seus próprios folículos, não reiniciam a meiose, nos permite concluir, que fatores derivados da célula da teca ou da granulosa inibem direta ou indiretamente a maturação meiótica os mamíferos. Em humanos foi isolada uma substância denominada MAS (esteróide ativador de meiose), que induz a retomada da meiose em oócitos circundados por cúmulus e em oócitos desnudos de camundongos. Uma vez pronta, a maturação nuclear e citoplasmática, a ovogênese está completa. Assim, o oócito pode ser fertilizado e sustentar o desenvolvimento embrionário, e para isso é muito importante o uso de meios adequados, como a co-cultura (HAFEZ, 1995).

2.5 EVENTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS NA MATURAÇÃO

A maturação nuclear *in vivo*, dura 24 horas na vaca. Sabe-se que a maturação do oócito, envolve duas fases: a primeira é a fase indutiva, ou seja, aquela que dura até que ocorra a GVBD. Nesta fase, o oócito sofre poucas mudanças estruturais ou sintéticas. Outra fase é a sintética, na qual a maioria dos componentes do oócito passam por uma reorganização (HAFEZ, 1995).

Um trabalho de MOOR et al., (1978) demonstraram que a alta concentração de estradiol encontrada no folículo preovulatório do bovino, foi mais importante do que a retomada da meiose. Na fase indutiva da maturação citoplasmática, as células do cúmulus têm grande importância, atuando como suporte.

A maturação do oócito é marcada pela completa organização intracelular e a formação da metáfase da 2ª divisão meiótica.

Na maturação *in vivo*, a morfologia ideal para alcançar melhores índices de clivagem é aquela que apresenta uma massa de células cúmulus expandida e não compacta ou sem cúmulus, (GORDON, 1994).

2.6 MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV)

Para o programa de FIV são colhidos oócitos de folículos primários, ou seja aqueles que medem de 2 – 8 mm, para que estes sejam maturados em meios adequados, a fim de se tornarem aptos à fertilização. Os melhores oócitos são aqueles que possuem várias camadas de células cúmulus, compactas. O ambiente no qual os oócitos irão se desenvolver deve ser o mais parecido possível com o trato reprodutivo da fêmea, tentando-se reproduzir as mesmas condições de temperatura, oxigenação, umidade e luminosidade, a fim de se obter, ao final do programa de fertilização *in vitro* os melhores resultados possíveis. Dessa forma, serão descritos a seguir vários métodos utilizados na MIV atualmente, (GORDON, 1994).

2.7 MEIOS DE CULTURA

O meio de cultura usado na maturação *in vitro* não somente pode afetar o número de oócitos que chega na metáfase II, sendo capazes de ser normalmente

fertilizados, como também influencia o desenvolvimento embrionário subsequente.

Os meios podem ser simples ou complexos. Os simples, são usualmente sistemas tampão bicarbonato, contendo basicamente, salina fisiológica com piruvato, lactato e glicose. As principais diferenças entre os vários tipos de meios simples, referem-se às concentrações iônicas e as concentrações das fontes energéticas. Os meios são geralmente complementados com soro ou albumina e antibióticos (penicilina, estreptomicina, gentamicina). Os meios complexos contêm, em adição aos componentes básicos do meio simples, aminoácidos, vitaminas, purinas e outras substâncias.

Um dos meios de MIV de oócitos bovinos mais largamente utilizados, é o meio de cultura de tecido 199 (M 199) (LU *et al.*, 1987;; XU e GREVE, 1987; Lu e POLGE,1992; XU *et al.*, 1992). Ele consiste de sal Earle's, tampão com N-(hidroxietil)-piperazina-N'-(2-ethansulfonic acid) (HEPES) e bicarbonato de sódio, além dos suplementos como, piruvato, lactato, aminoácidos, vitaminas, purinas, e outras substâncias encontradas no soro. Na Dinamarca e no Canadá tem sido utilizado o meio complexo Ham's F-10 para MIV (HAWK e WALL, 1993). Este meio contém um sistema tampão Krebs Ringer bicarbonato, suplementado com piruvato, lactato, aminoácidos, vitaminas e outros elementos encontrados no soro. São adicionadas ainda timidina hipoxantina, albumina, soro e penicilina e estreptomicina. Na Alemanha, BEHRENS (1992), relatou ter usado o meio modificado Menezo-B2.

No Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) – Curitiba, TAHIRA *et al.*, 2000) utilizaram o meio de maturação TCM 199, acrescido de 5 % de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina e estreptomicina).

2.8 QUALIDADE DE FOLÍCULOS E OÓCITOS

2.8.1 Atresia folicular

Durante todas as fases do ciclo ovariano, vários folículos entram em atresia, ou seja, sofrem modificações degenerativas, diante das quais os folículos perdem sua integridade. Isso ocorre principalmente nos estágios avançados do crescimento folicular. A atresia está associada a várias modificações morfológicas, bioquímicas e histológicas, que variam com o estágio folicular e com a espécie animal em questão. A degeneração é acompanhada pela perda do oócito, das células granulosas, dos receptores de variados hormônios atrás das células tecais, que formam células glandulares no interstício ovariano, possuindo características de tecidos esteroideogênico. Regulando a atresia folicular atuam os seguintes fatores: idade, fase do ciclo reprodutivo, gestação, lactação, balanço entre estrógenos e andrógenos de fontes intra ou extra- ovarianas, genética, nutrição e isquemia (HAFEZ, 1995).

MOOR *et al.* (1978); KRUIP e DIELEMAN (1982); e McNATTY *et al.* (1984) descreveram critérios de classificação de folículos bovinos, havendo poucas diferenças entre eles. Em geral, foram classificados como não atrésicos, aqueles que apresentavam-se translúcidos, brilhantes, com vasta vascularização e camada granulosa regular, sendo considerados atrésicos, aqueles que apresentavam características opostas à essas.

2.8.2 Morfologia dos oócitos

Desde 1979, estudos vem sendo realizados sobre a morfologia dos oócitos e desde então vários esquemas de classificação têm sido propostos.

LOOS *et al.* (1989 e 1991), classificaram os oócitos em 1, 2, 3, e 4 e YOUNIS *et al.* (1989), os classificaram em selecionáveis e não selecionáveis, de acordo com sua qualidade, baseando-se no número de camadas de células do cúmulo e homogeneidade do citoplasma. Considerou-se de melhor qualidade, aqueles que apresentavam maior número de camadas do cúmulo, compactas e citoplasma mais homogêneo.

LONERGAN (1992), comparou a eficiência dos vários tipos de oócitos usados na MIV, e concluiu que oócitos desnudos e com camadas de cúmulo expandidas, apresentavam eficiência bem menor, comparados aqueles envolvidos por camadas de cúmulo, sendo ainda observado, que quanto maior o número de camadas compactas, melhor a eficiência.

2.8.3 Efeito do tempo de maturação

Durante a MIV, GVBD ocorre entre 3 ou até mais de 12 horas de cultura. Embora haja exceções, a eliminação do primeiro corpúsculo polar, ocorre entre 18 e 24 horas depois do início da maturação (SREENAN, 1968; XU *et al.* 1986).

SIRARD *et al.* (1989), relataram os seguintes eventos nucleares durante a MIV, sendo a VG evidente de 0 à 6,6 horas, a GVBD entre 6,6 e 8 horas, a condensação da cromatina de 8 a 10,3 horas, a metáfase I de 10,3 a 15,4 horas,

a anáfase I de 15,4 a 16,6 horas, a telófase I de 16,6 a 18 horas, e a metáfase II entre 18 a 24 horas.

XU *et al.* (1986), relataram que a maturação dos oócitos envolvidos por camadas de cúmulus compacta, é mais lenta que os parcialmente envolvidos e desnudos.

Foram realizados estudos comparando-se a eficiência de produção de blastocistos, em períodos de maturação de 18 e 24 horas, concluindo-se que em termos de maturação e clivagem não houve diferença significativa. No entanto, essa diferença foi observada na produção final de blastocistos (LU,1990;MONAGHAN *et al.*, 1993;). PROKOFIEV *et al.* (1992) e SEMPLE *et al.* (1993), não encontraram diferenças significativas em períodos de maturação de 14 e 18 horas.

McEVOY *et al.* (1997), fizeram estudo comparando o tempo de maturação (16 e 24 horas), e o método de colheita de oócitos, ou seja, colheita via transvaginal em vacas superovuladas (VSO) e colheita a partir de ovários de vacas não estimuladas (VNE). Em ambos os grupos, os resultados foram melhores às 24 horas. Porém, no VNE, a competência de desenvolvimento foi bem menor às 16 horas em relação ao VSO, apresentando 23% de clivagem e 4% de blastocistos, contra 62% e 15% respectivamente.

2.8.4 Efeito da temperatura na MIV

Até 1980, a grande maioria dos pesquisadores usava a temperatura de 37° C para proceder a MIV. Porém, visto que a temperatura média retal da vaca oscila

entre 38 e 39.3° C, estudos sobre temperatura na MIV foram retomados. LENZ *et al.* (1983), compararam várias temperaturas na MIV e concluíram que a maturação não foi afetada por temperaturas entre 35 e 39° C, mas a fertilização provou ser temperatura-dependente, pois mostrou que o grau de fertilização foi bem maior a 39° C que a 35, 37 e 41° C.

2.8.5 Uso do óleo mineral

O uso do óleo mineral sobre a maioria das soluções utilizadas na FIV, tem a finalidade de protegê-las contra contaminações externas, e da evaporação e conseqüente alteração do pH. Apesar de seu efeito protetor, possibilita as trocas gasosas. Porém, cuidados em relação à toxicidade, devido a sua exposição à luz ultravioleta e outros devem ser tomados (GORDON, 1994).

2.8.6 Uso do soro bovino nos meios de maturação

Os vários tipos de soro bovinos no meio de maturação têm o objetivo de fornecer proteínas ao mesmo.

Atualmente os vários tipos de soro utilizados são: soro fetal bovino (FCS), soro de vaca em estro (OCS), soro de vaca em pro-estro (SPE – coletado no primeiro dia de estro), soro de vacas superovuladas (SSV), soro de novilhos (SNC), além dos substitutos destes soros. FCS e OCS, têm sido os mais usados. Outros estudos realizados por LU *et al.* (1987), demonstraram uma superioridade

significativa do OCS em relação ao FCS. Outros estudos chegaram à mesma conclusão, tais como SANBUISSHO, (1989) e SCHELLANDER *et al.*, (1990).

YOUNIS *et al.* (1989), sugeriram que SPE foi mais efetivo na MIV que OCS. LONERGAN (1992), sugeriu que SNC é tão efetivo quanto OCS, com a vantagem de ser facilmente colhido.

Em um estudo de ARLOTTO (1998), foi observado que quando foi usado o SNC, não houve necessidade de suplementação de FSH/LH, pois a adição destes não afeta o desenvolvimento subsequente. Os níveis de soro freqüentemente usados são de 20%, porém podem variar de 10 a 20%.

2.8.7 Efeito do gás atmosférico

Nos últimos anos registra-se muitos progressos no desenvolvimento de sistemas para a produção *in vitro* de embriões bovinos com propósitos experimentais e comerciais. Somente uma proporção moderada de zigotos bovinos derivada das técnicas de maturação *in vitro* (MIV) e fertilização *in vitro* (FIV) desenvolvem até a fase de blastocisto *in vitro*. Inúmeros estudos tem sido realizados com intuito de melhorar as condições de culturas para o desenvolvimento desses embriões. Entretanto, apesar desses esforços, grandes avanços na melhoria dos resultados da MIV, FIV e na cultura *in vitro* (CIV), (GORDON, 1994), foram verificados.

SUZUKI *et al.* (1999) recentemente desenvolveram incubadora com CO₂, simples, portátil e econômica, utilizando grânulos efervescentes (EG). A composição da atmosfera na qual os embriões bovinos se desenvolvem é um dos

mais importantes fatores para o seu desenvolvimento. A variação de 2,5 a 5,0 % de CO₂ é tido como ótimo por muitos pesquisadores (THOMPSON *et al.*, 1990); VOELKEL e HU, (1992); PINYOPUMMINTR e BAVISTER, (1995). Mais recentemente, outros pesquisadores avaliaram os efeitos da alteração da atmosfera durante o desenvolvimento de embriões em camundongos (HARLOW, 1978; EPPIG *et al.*, 1990; QUINN e UMAOKA *et al.*, 1992), hamster (McKIERNAN e BAVISTER, 1990), suínos (WRIGHT, 1977); ovinos (WRIGHT *et al.*, 1976; BETTERBED e WRITE, 1985) e bovinos (TERVIT *et al.*, 1972; THOMPSON *et al.* 1990; NAGAO e NAKASUJI, 1990; FUKUI *et al.*, 1991; YANG *et al.*, 1994) ao afirmarem que a concentração de 5 a 10 % de oxigênio é ótima para a cultura de embriões.

3. Material e métodos

3.1 Colheita de ovário no matadouro

A colheita de ovários foi realizada imediatamente após o abate do animal, retirando-se diretamente da carcaça, removendo-se as gorduras, os ovidutos e outros tecidos peri-ovarianos. Após este trabalho, os ovários foram lavados em solução salina (0,9% de NaCl) a 25°C e colocados numa garrafa térmica contendo solução salina à temperatura de 25°C e transportados ao laboratório com no máximo 5 horas pós-morte (FIGURA 01).

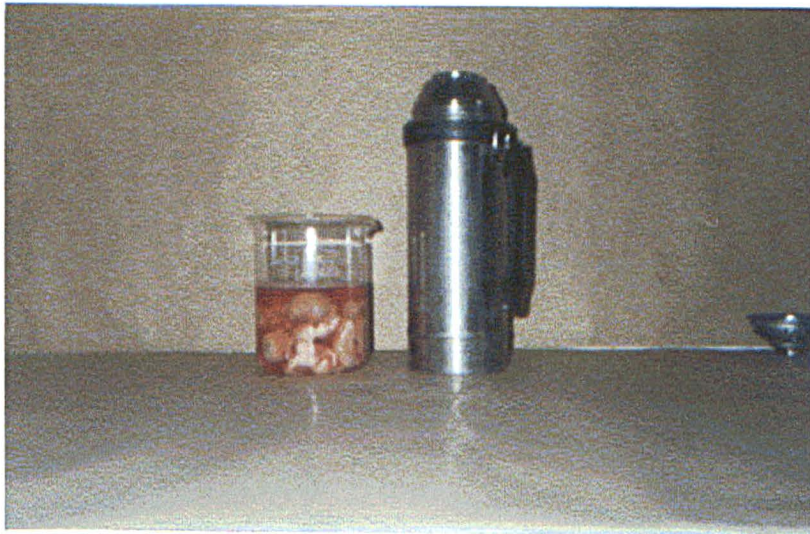


FIGURA 01 – OVÁRIOS BOVINOS COLHIDOS IMEDIATAMENTE APÓS O ABATE LAVADOS COM NaCl A 0,9% E GARRAFA TÉRMICA CONTENDO SOLUÇÃO FISIOLÓGICA A 25 ° C PARA TRANSPORTE.

3.2 Procedimentos para a aspiração dos oócitos

No laboratório os ovários foram lavados duas a três vezes com solução salina à temperatura de 30°C, e então, transferidos para um becker e mantidos em banho-maria na mesma temperatura (FIGURA 02).



FIGURA 02 – LAVAGEM DOS OÓCITOS BOVINOS COM SOLUÇÃO SALINA A 30°C, NO LABORATÓRIO (CURITIBA) 2001.

Os oócitos foram aspirados de folículos de 2 a 8 mm de diâmetro, com auxílio de uma seringa de 5 ml adaptada a uma agulha 18G contendo 1,0 a 1,5 ml de PBS (solução salina fosfatada) (FIGURA 03). Após a aspiração dos folículos, o fluído contido na seringa foi transferido vagarosamente para uma placa de petri aquecida, para evitar a destruição das células do cúmulus.

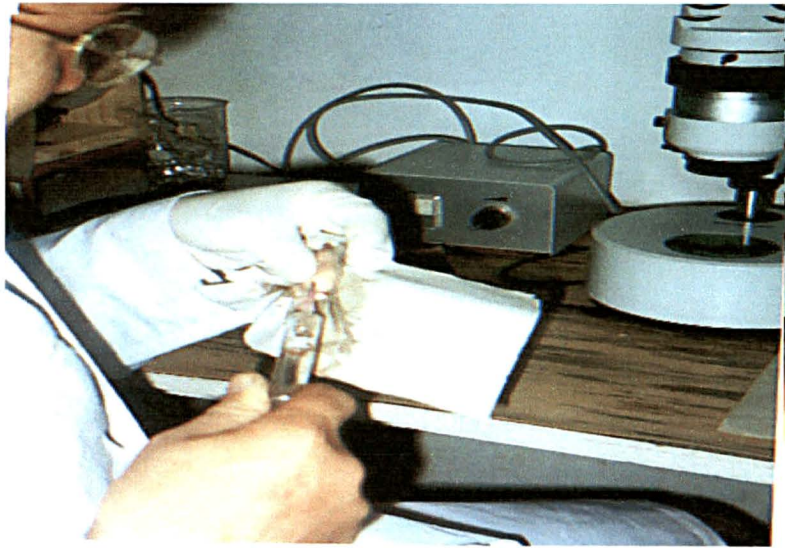


Figura 03- ASPIRAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS DE FOLÍCULOS DE 2 A 8 mm COM SERINGA DE 2 ml ADAPTADA EM AGULHA 18G CONTENDO 1,0 A 1,5 ml DE SOLUÇÃO SALINA FOSFATADA(PBS) (CURITIBA),2001.

3.3 PESQUISA E CLASSIFICAÇÃO DE OÓCITOS

Os oócitos contidos na placa de Petri foram pipetados e transferidos para outra placa contendo PBS. Estes oócitos aspirados foram lavados com a mesma solução por duas a três vezes e então, classificados da seguinte forma (FIGURA 04):

- A - Completamente cobertos pelas células cúmulus.
- B - Parcialmente cobertos pelas células cúmulus.
- C - Oócitos desnudos.
- D - Cobertos por fibrina.

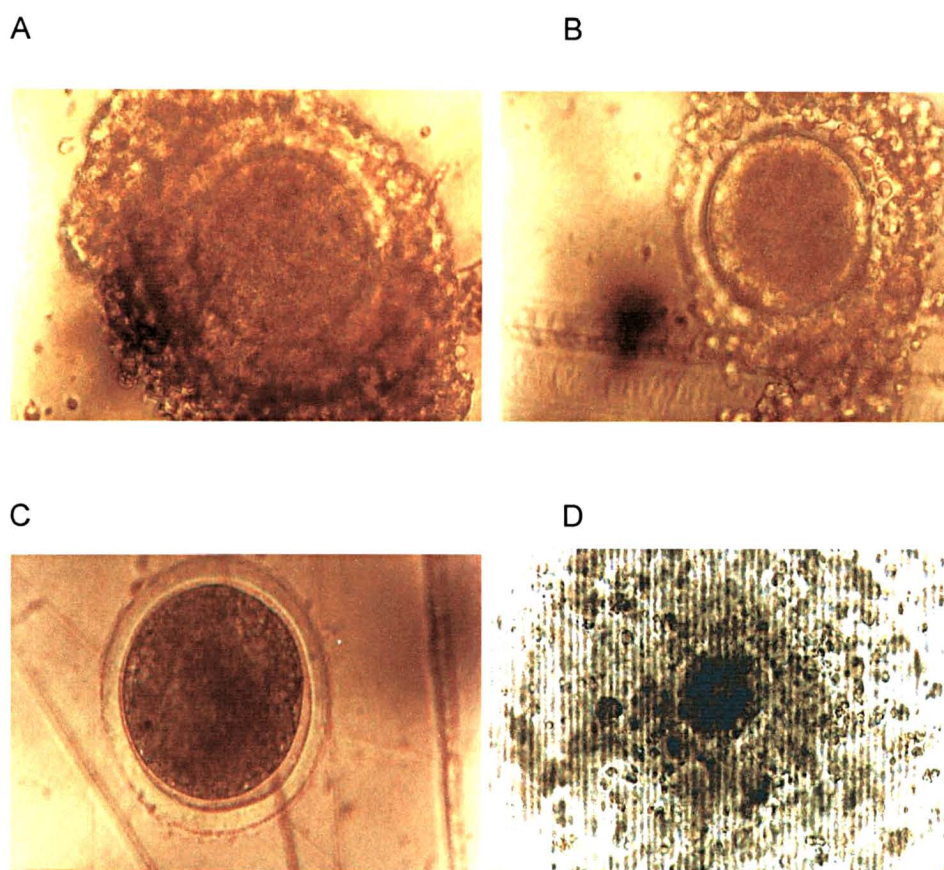


FIGURA 04 – CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE ÓOCITOS BOVINOS
COLHIDOS DE OVÁRIOS DE FÊMEAS ABATIDAS.- 2.000

Os oócitos classificados como A e B foram aproveitados para a maturação e os C e D descartados. Após a classificação, foram lavados duas vezes no meio de maturação (TCM-199) e transferidos para gotas contendo o mesmo meio (100 μ l) (FIGURA 05).

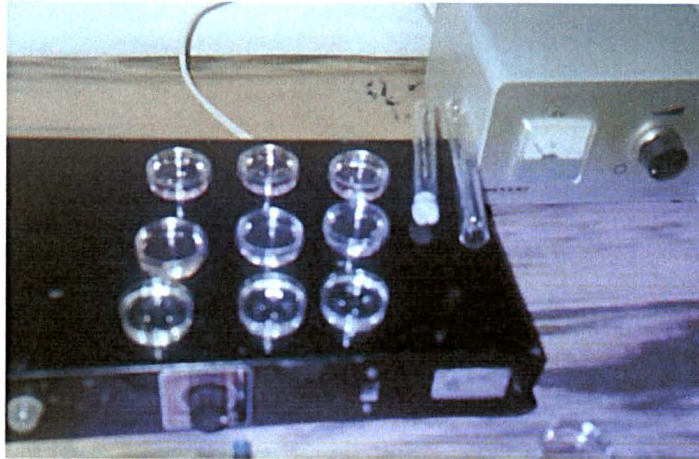


FIGURA 05- GÔTAS CONTENDO MEIOS (TCM-199) PARA
MANUTENÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS
(CURITIBA),2001..

3.4 DESCRIÇÃO DA INCUBADORA DE CO₂ PORTÁTIL.

Para o desenvolvimento da incubadora portátil foi utilizado um frasco de vidro que pudesse ser hermeticamente fechado (FIGURA 06, FIGURA 6.1), com capacidade de 600ml. Na lateral do frasco foi feito um furo de 5 mm, onde foi adaptado um tubo de plástico da mesma espessura. Ao tubo foi conectada uma mangueira de borracha permitindo abrir ou fechar (FIGURA 07). A água foi introduzida com seringa e o fechamento da mangueira foi através da utilização de pinça. Na tampa do frasco foram colocadas os sais efervescentes, e um suporte foi adaptado para evitar o contato da placa de Petri (gotas contendo oócito) com a água necessária para liberação de CO₂ (FIGURA 08).

FIGURA 06 E 07 –INCUBADORA PORTÁTIL DE CO₂ PARA MATURAÇÃO
DE OÓCITOS BOVINOS.(CURITIBA),2001.



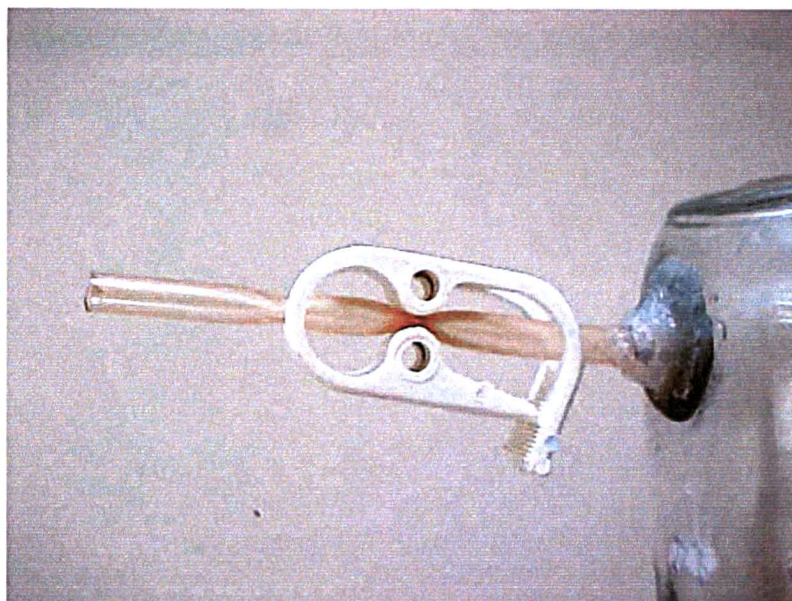


FIGURA 08- MANGUEIRA CONECTADA À CUBA QUE PERMITE A INJEÇÃO DE ÁGUA SOBRE OS SAIS EFERVESCENTES.(CURITIBA),2001.



FIGURA 09- GÔTAS CONTENDO OÓCITOS EM MATURAÇÃO EM TCM-199 NA PLACA DE PETRI.(CURITIBA),2001.

3.5 MATURAÇÃO DOS OÓCITOS

As placas contendo as gotas com oócitos foram colocadas em cubas de vidro contendo diferentes quantidades de substâncias efervescentes (2,31 g bicarbonato de sódio; 2,19 g ácido cítrico e 0,50 g carbonato de sódio) obtendo-se diferentes porcentagens de gás carbônico (CO₂). Nas cubas as quantidades de efervescente e gás carbônico foram, respectivamente, 0,138 g/l e 2% de CO₂; 0,345 g/l e 5% de CO₂; 0,4769 g/l e 7% de CO₂; 0,6907 g/l e 10% de CO₂, em 5 ml de água destilada (FIGURA 09). Estas, foram mantidas à temperatura de 38.5° C, por período de 20 horas. Após este período, os oócitos foram retirados das gotas de maturação e transferidos para gotas de 20 µl de hialuronidase (5% em PBS) durante 5 minutos, para facilitar a retirada das células *cúmulus* propiciando a melhor visualização do corpúsculo polar (Metáfase II), indicativo da maturação do oócito (FIGURA 10, FIGURA 10.1).

Os dados foram anotados em fichas próprias e posteriormente avaliados pelo teste de X² para determinar significância das diferenças entre grupos independentes a nível de 5% (COCHRAN, 1952 e 1954; SIEGEL, 1975).



FIGURA 10- INJEÇÃO DE ÁGUA SOBRE OS SAIS PARA LIBERAÇÃO DE CO₂ (CURITIBA),2001.

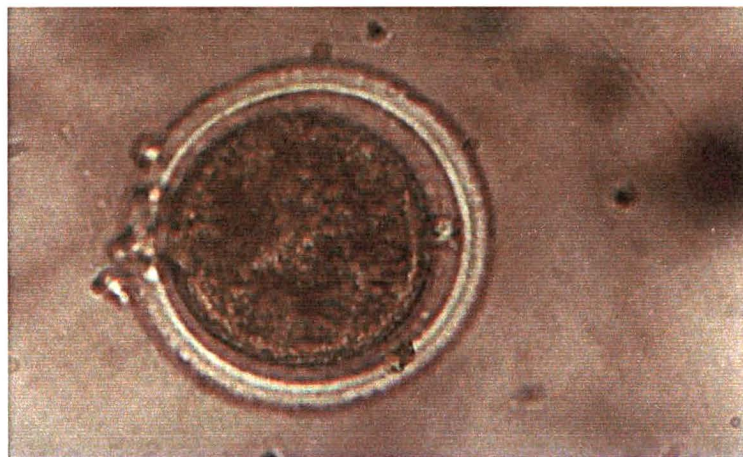


FIGURA 11- PRESENÇA DO CORPÚSCULO POLAR NO OÓCITO DE BOVINO MATURADO IN VITRO.(CURITIBA),2001.

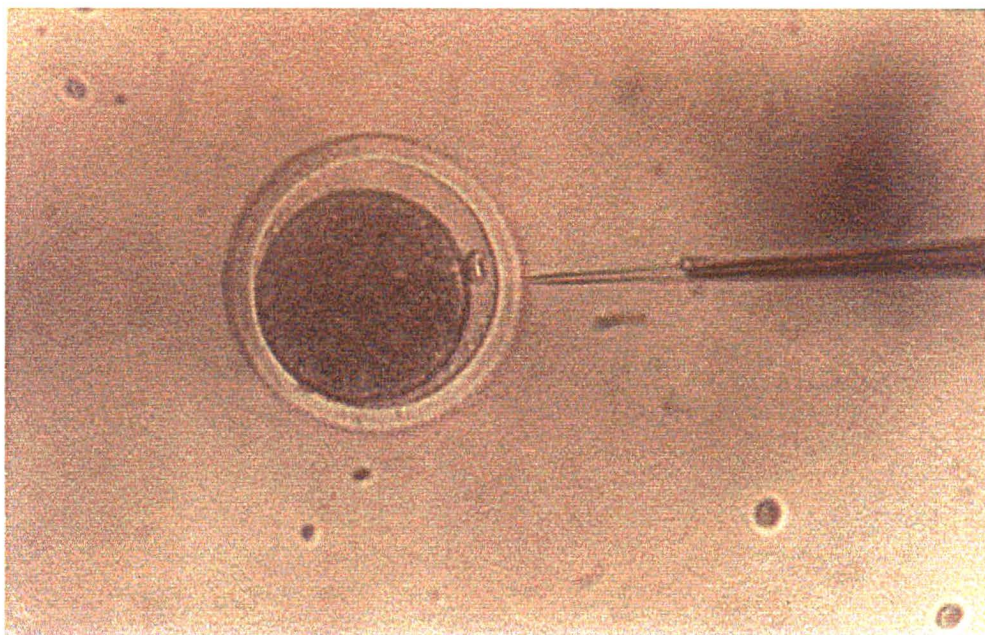


FIGURA 12- PRESENÇA DO CORPÚSCULO POLAR NO
OÓCITO BOVINO MATURADO IN VITRO.
(CURITIBA),2001.

4. RESULTADOS

Nesse experimento foram testadas diferentes quantidades de sais efervescentes que produziram no interior das cubas, diferentes atmosferas de CO₂, de acordo com as concentrações (aproximadamente 2.0; 5.0; 7.0 e 10.0%), objetivando a maturação de oócitos bovinos, com intuito de desenvolver uma incubadora portátil e econômica que possa ser utilizada em condições extra laboratório.

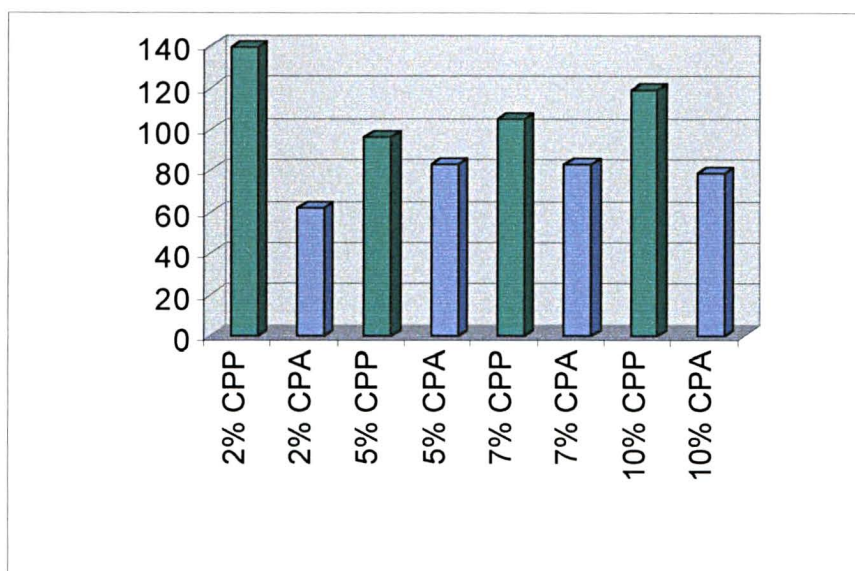
Do total de 766 oócitos selecionados para à maturação 201, 179, 188 e 198 pertenceram aos tratamentos 2.0; 5.0; 7.0 e 10.0% de CO₂, respectivamente (TABELA 01 e GRÁFICO 01). Nas diferentes concentrações, as porcentagens de oócitos que apresentaram corpúsculo polar após 20hs de incubação foram de 69.1; 53.6; 55.8 e 60.1% respectivamente.

TABELA 01. EFEITOS DE DIFERENTES QUANTIDADES DE SAIS EFERVESCENTES (gramas/litro) NA CONCENTRAÇÃO DE CO₂ PARA DESENVOLVIMENTO DOS OÓCITOS BOVINOS EM UMA INCUBADORA PORTÁTIL (CURITIBA), 2001.

Quantidade de sais efervescentes (g/l)	CO ₂ (%)	Nº de oócitos		Total
		Presença de corpúsculo polar (%)	Ausência de corpúsculo polar (%)	
0,138	2,0	139 (69,15) ^a	62 (30,85)	201
0,345	5,0	96 (53,63) ^b	83 (46,37)	179
0,4769	7,0	105 (55,85) ^b	83 (44,15)	188
0,6907	10,0	119 (60,10) _{ab}	79 (39,9)	198

* a; b; = colunas com letras diferentes são significativamente diferentes (P<0,05)

GRÁFICO 01. COMPARAÇÃO GRÁFICA DE ÓOCITOS BOVINO COM PRESENÇA (CPP) E AUSÊNCIA (CPA) DE CORPÚSCULO POLAR EM DIFERENTES ATMOSFERAS DE CO₂. CURITIBA-PR.-2001.



De forma descritiva, os resultados que se encontram na tabela 1 indicam que houve um percentual maior de maturação quando usamos atmosfera de 2% de CO₂, todavia podemos verificar que a atmosfera de 10% de CO₂ apresentou resultados melhores que as concentrações de 5 e 7%, que não repetem os dados demonstrados nos trabalhos de THOMPSON et al., 1990; VOELKEL e HU, 1992; PINYOPUMMINTR e BAVISTER 1995, quando comprovaram que a composição ótima para maturação, fertilização e cultura in vitro de oócitos bovinos, com células cúmulus intactas, deu-se respectivamente entre 2.5 e 5% de CO₂ e com 20% de O₂.

Os mesmos autores descreveram que o aumento de concentração de CO₂ para 10%, não melhoraram os resultados, mas ao contrário, reduziram o índice normal de fertilização.

4.1 ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.1.1 Teste para o total de observações:

As hipóteses previamente formuladas eram de que:

H₀: A proporção de oócitos que **tiveram** formação de corpúsculo polar é **igual** à proporção de oócitos que **não tiveram** formação de corpúsculo polar para todos os níveis de CO₂.

H₁ A proporção de oócitos que **tiveram** formação de corpúsculo polar **difere** da proporção de oócitos que **não tiveram** formação de corpúsculo polar para **ao menos um** nível de CO₂.

Ou seja, estamos justamente testando se há diferença estatística significativa na formação do corpúsculo polar nos oócitos para os vários níveis de CO₂.

Os dados obtidos após a realização do experimento estão mostrados na tabela 2 abaixo:

TABELA 02 - OÓCITOS versus CONCENTRAÇÃO(CURITIBA),2001.

Concentração de Co2	2%	5%	7%	10%	Total
Oócitos Maturados	139	96	105	119	459
Oócitos não Maturados	62	83	83	79	307
Total	201	179	188	198	766

$\chi^2=11.3844$ com p – valor de 0,009819

Os dados acima foram analisados, pelo teste Qui-Quadrado que verifica a proporção observada e a esperada para cada nível de CO₂ no que refere-se a presença e ausência de corpúsculos polar no oócito e, então, avaliamos se a diferença dentre essas duas proporções em conjunto para todos os níveis de CO₂ é significativa.

Como a priori, selecionamos um nível $\alpha=5\%$ ($p=0,05$), se o teste Qui-Quadrado retornar um valor menor que este nível, rejeitaríamos a hipótese H_0 em favor de H_1 .

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos muitas pesquisas tem sido realizadas no intuito de desenvolver sistemas de produção de embriões bovinos *in vitro* para fins comerciais. Uma das dificuldades em um país continental como o nosso, é o tempo para remessa de materiais colhidos (oócitos de ovários de vacas abatidas ou de vacas vivas) para laboratórios de fertilização *in vitro*, não devendo-se ultrapassar de 5 horas, entre a colheita e o início do processo de maturação (YANG et al., 1990; VERGOS, 1990; LONERGAN, 1992). Nesta pesquisa objetivou-se desenvolver uma incubadora de CO_2 , simples, portátil e econômica, para ser utilizada a nível de campo. A composição da atmosfera na qual os oócitos são maturados é um dos fatores mais importantes nesta etapa do desenvolvimento, razão pela qual foram testadas diferentes quantidades de sais efervescentes para produzir diferentes concentrações de CO_2 na maturação dos oócitos de bovinos.

O melhor ambiente para a maturação *in vitro* foi de 2.0% de CO_2 (0,138 g/l) quando comparado com 5.0% (0,345 g/l); 7.0 % (0,476 g/l) e 10.0% (0,6907 g/l). Os testes de X^2 indicaram que há diferença significativa podendo-se perceber que a quantidade de 2.0% de CO_2 mostrou-se mais eficiente no que se refere a maior quantidade de oócitos com corpúsculo polar.

Esta eficiência já havia sido comprovada nos trabalhos de vários autores (THOMPSON et al., 1990; VOELKEL e HU, 1992; PINYOPUMMINTR e

BAVISTER, 1995) quando afirmaram ser esta a composição ótima do gás para a maturação, fertilização e cultura *in vitro* de oócitos bovinos. Comprovaram também que o aumento na concentração de CO₂ para 10% não melhoravam os resultados e sim reduziram o índice normal de fertilização. Estes resultados sugerem que os oócitos bovinos são sensíveis à mudanças de pH durante a fertilização e que nessa concentração a cultura *in vitro* não induz a um aumento de pH.

WHITTEN (1957) demonstrou que há necessidade de um mínimo de O₂ para o desenvolvimento e sobrevivência de embriões de camundongo *in vitro* e que a concentração elevada é tóxica. Há uma concordância de vários autores que a concentração de 5 a 10% de O₂ é ótima para a cultura de embriões, em camundongos (QUINN e HARLOW, 1978; EPPIG *et al.*, 1990; UMAOKA *et al.*, 1992), hamster (McKIERNAN e BAVISTER, 1990), suínos (WRIGTH, 1977), ovinos (WRIGTH *et al.*, 1976; BETTERBED e WRITE, 1985), bovinos (TERVIT *et al.*, 1972; THOMPSON *et al.*, 1990; NAGAO e NAKASUJI, 1990; FUKUI *et al.*, 1991; YANG *et al.*, 1994; SUZUKI *et al.*, 1999). Outros autores discordam deste ponto de vista (BETTERBED e WRITE, 1985; UMAOKA *et al.*, 1992).

6. Conclusões

No desenvolvimento da incubadora de CO₂ portátil, os resultados deste experimento demonstraram as seguintes conclusões:

- A incubadora portátil foi eficaz no processo de maturação *in vitro* de óocitos bovinos, o que pode determinar sua utilização para o transporte de óocitos em plena maturação.
- A concentração de 2% de CO₂ (0,138 g/l de sais efervescentes) foi mais eficiente para a maturação *in vitro* de óocitos bovinos que as demais utilizadas no experimento, ou sejam; 5% (0,345 gr/l), 7% (0,4769 gr/l) e 10% (0,6907 gr/l).
- A utilização das incubadoras portáteis com eficiência controlada, poderá aumentar o tempo entre a colheita e chegada do material ao laboratório de fertilização *in vitro*, de 5 para 20 horas, já que a fase de crescimento do óocito até alcançar a metáfase poderá ocorrer na incubadora.
- Há necessidade de mais estudo para avaliar a concentração de O₂ e testar as concentrações de CO₂ para os processos de fertilização e cultura *in vitro* de embriões bovinos na incubadora de CO₂ portátil.

Referências

- ARLOTTO, T.; The effect of hormonal supplementation of steer serum during bovine oocytes maturation on subsequent *in vitro* embryo development. *Theriogenology*, v. 49, n. 305, 1998.
- AUSTIN, C.R. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Australian Journal of Scientific Research*. n. 4, p. 581-596, 1951.
- BEHRENS, C. Investigations on *in vitro* maturation, fertilization and culture of bovine oocytes in modified menezzo-B2 medium. Thesis, Therärztliche Hochschule Hannover, Germany, 1992.
- BETTERBED B.; WRITE R. W. Jr. Development of one-cell ovine embryos in two culture media under two gas atmospheres. *Theriogenology*, n. 23, p. 547-553, 1985.
- BRACKETT, R.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DONAWICK, W. J.; EVANS, J. F.; DRESSEL, M. A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biology of reproduction*, n. 27, p. 147-158, 1982.
- CHANG, M. C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tube. *Nature*, n. 168, p. 697-698, 1951.
- COCHRAN, W. G. The X^2 test of goodness of fit. *Ann Math Statist.*, n. 23, p. 315-345, 1952.
- COCHRAN, W. G. Some methods for strengthening the common X^2 tests. *Biometrics*, n. 10, p. 417-451, 1954.
- ERICKSON, B. H. Development and response of the prenatal bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, n. 10, p. 97- 105, 1966.
- EPPIG, J. J.; SCHOEDER, A. C.; VAN de SANDT, J. J. M; ZIOMEK, C. A.; BAVISTER, B.D. Developmental capacity of mouse oocytes that grow and mature in culture: the effect of modification of the protocol. *Theriogenology*, n. 33, p. 1155-1163, 1990.
- FUKUI, Y.; MCGOWA, N L.T; JAMES, R.W.; PUGH, P.A.; TERVIT, H. R Factors affecting the *in vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J.Reprod. Fertil*, n. 92, p. 125-131, 1991.
- GORDON, I. *Laboratory production of cattle embryos*. Cambridge, Cab. International, 1994.
- HAFEZ, E. S. E. *Reprodução animal*. São Paulo : Manole, 1988.

HAWK, H.W.; WALL, R. J. Experiments to improve the yield of bovine blastocysts from *in vitro* produced oocytes. *Journal of Animal Science*. (Supple 1), n. 220, 1993.

IRITANI, A .; NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilizaion *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *Journal of Reproduction and Fertility*, n. 50, p. 119-121, 1977.

KALOUS, S. J.; SUTOVSKY, P.; RIMKEVICOVA, Z.; SHIOYA, Y.; LIE, B. L., MOTLIK J. Pig membrana granulosa cells prevent resumption. *Biology of Reproduction*, v. 48 (suppl1), n. 123, 1993.

KING, W. A.; BETTERIDGE, K. J.; BOUSQUET, D; GREVE, T. Cytologically detectable abnormalities in bovine zygotes after *in vivo* and *in vitro*. *Fertilization Journal Dairy Science*. n. 68 (supple 1), p. 148, 1985.

KRUIP, A . M. .; CRAN, D. G. ; BENEDENT, T. H.; DIELEMAN, S. J. Structural ghanges in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. *Gamete research*. n.8, p. 29-47, 1983.

KRUIP, A. M. ; DIELEMAN. S. J. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorfological and steroid biochemical procedures. *Reproduction. Nutrition and Development*, n. 22, p. 465-473, 1982.

LENZ, R. W.; BALL, G. D.; LEIBFRIED, M. L.; AX,R. L. First, N. L. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature- dependent processes. *Biology of Reproduction*, n. 29, p. 173-179, 1983.

LU, K. H.; GORDON, I. ; GALLAGHER, M.; McGOVERN, H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of follicular oocytes matured *in vitro*. *Veterinary Record*, n. 121, p. 159-260, 1987.

LONERGAN, P. Studies in the *in vitro* maturation, fertilization and culture of bovine follicular oocytes. PhD. Thesis, National University of Ireland, Dublin, 1992.

LOOS, de F.A.M., BEVERS, M. M. ; DIELEMAN, S. J.; KRUIP; T. A.M. Morphology of preovulatory bovine follicles as related to oocyte maturation. *Theriogenology*, n. 35, p. 527-535, 1991.

LOOS, de F., van VLIET, C.; van MAURIK, P; KRUIP ,Th A.M. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Research*, n. 24, p. 197-204, 1989.

LOOS de F. A. M. ; JEUKEN, M.; ZEINSTR, E.; BEVERS M. M. Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes cultured *in vitro*. In: PROCEEDINGS OF THE TWELFTH INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION (THE HAGUE), 1, p. 357-359, 1992.

LU, K. H. *Studies related to the in vitro maturation and fertilization of ovarin oocytes in cattle*. PhD thesis, National University of Irland, Dublin, 1990.

LU, K. H.; GORDON, I. ; GALLAGHER, M.; McGOVERN, H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of follicular oocytes matured *in vitro*. *Veterinary Record*, n. 121, p. 159-260, 1987.

LU, K.H.; POLGE, C. A summary of two years results in large scale *in vitro* bovine embryo production. In: PROCEEDINGS OF THE TWELFTH INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION (THE HAGUE), 3, p. 1315-1317, 1992.

Mc EVOY, T. G.; STAINES, N. E.; DOLMAN, D. F.; WATT, R. G.; HIGGINS, L. C.; BROADBENT, P. I. *In vitro* maturation for 16 or 24 h and subsequent development of oocytes recovered *in vivo* from FSH - stimulated heifers or post mortem from unstimulated ovaries. *Theriogenology*, n. 47, p. 193, 1997.

McKIERNAN, S. H. ; BAVISTER, B. D. Environmental variables influencing *in vitro* development of hamster 2-cell embryos to blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, n. 43, p. 404-413, 1990.

McNATTY, K. P. ; HEATH, D. A.; HENDERSON, K. M.; LUN, S. ;HURST, P. R.; ELLIS, L. M.; MONTGOMERY, G. W. ; MORRISON L.; THURLEY D.C. Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. *Journal of reproduction and fertility*, n. 72, p. 39-53, 1984.

MONAGHAN, P.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; SHARIF, H.; WAHID, H.; GORDON I. The effect of maturation time on the subsequent *in vitro* development of bovine oocytes. *Theriogenology*, n. 39, p. 270, 1993.

MOOR, R. M.; HAY, M. F.; DOTT, H. M.; CRAN, D. G. Macroscopic identification and steroidogenic function of atretic follicles in sheep. *Journal of Endocrinology*, n. 77, p. 309-318, 1978.

NAGAO, H.; NAKASUJI, N. Effect of co-culture medium components and gas phase on *in vitro* culture matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. *Theriogenology*, n. 33, p. 591-600, 1990.

PINCUS, G. ; ENZMANN, E.V. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. *Journal experimental medicine*, n. 62, p. 665-675, 1935.

PINYOPUMMINTR, T.; BAVISTER, B. D. Optimum gas atmosphere for *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, n. 44, p. 471-477, 1995.

PROKOFIEV, M. I. ; ERNST, L. K.; SURAEVA, N. M.; LAGUTINA, I. S.; UDAVLENNIKOVA, N. N.; KESYAN, A.Z. ; DOLGOHATSKIY A.I. Bovine oocyte maturation, fertilization and further. Development *in vitro* and after transfer into recipients. *Theriogenology*, n. 38, 461-469, 1992.

QUINN, P.; HARLOW, G. M. The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, n. 206, p. 73-80, 1978.

RICHARD, F.; SIRARD, M.A. The effect of co-culture of follicular components with bovine oocytes on meiotic resumption. *Biology of Reproduction*, n. 48 (suppl. 1), n. 123, 1993.

SANBUISSHO A. Influence of serum and gonadotrophins on *in vitro* bovine oocyte maturation and fertilization. *Dissertation Abstracts International B, Sciences and Engineering*, n. 49, p. 3046, 1989.

SCHELLANDER, K. ; FUHRER, F.;BRACKETT, B. G.; KORB, H. ; SCHLEGER, W. *In vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplement with estrous cow serum. *Theriogenology*, n. 33, p. 477-485, 1990.

SEMPLE, E.; LOSKUTOFF, N.; LEIBO, S. P.; BETTERIDGE K.J. Effect of culture medium and maturation time on *in vitro* development of bovine oocytes into blastocysts. *Theriogenology*, n. 39, p. 307, 1993.

SIEGEL, Sidney. *Estatística não-paramétrica (para ciências do comportamento)* São Paulo : Mcgrae-Hill Ltda. 1975.

SIRARD, M.A.; COENEN, K.; BILODEAU, S. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology*, n. 37, p. 811-815, 1989.

SIRARD, M.A.; BILODEAU S. Live granulosa cells can maintain meiotic inhibition of bovine oocytes *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 42 (suppl.1), n. 90, 1990.

SREENAN, J. M. *In vivo* and *in vitro* culture of cattle eggs. In: *Proceedings of The Sixth International Congress On Animal Reproduction And Artificial Insemination*, 1. Paris, p. 577-580, 1968.

SUZUKI, T.; SUMANTRI, C.; KHAN, N. H. A.; MURAKAMI, M.; SAHA, S. Development of a simple, portable carbon dioxide incubator for *in vitro* production of bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, n. 54, p. 149-157, 1999.

TERVIT H. R.; WHITTINGHAM, D. G.; ROWSON, L.E.A. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.*, n. 30, p. 493-497, 1972.

THOMPSON, J. G. E., SIMSON, A.C., PUGH P.O., DONNELLY P.E., TERVIT, H.R. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of pre implantation sheep and cattle embryos. *J. Reprod. Fertil.*, n. 89, p. 573-578, 1990.

TAHIRA, J. K.; KUSSAKAWA, K. C. K.; BUDZIAK, A. G.; STELLA, V. Efeitos do sêmen na fertilização *in vitro* de óocitos bovinos. In: *ANAIS VIII REUNIÃO ANUAL Sociedade Brasileira de Pesquisadores Nissei (S.B.P.N)*, p.189, 2000.

UMAOKA, Y.; NODA, Y.; NARIMOTO, K.; MORI, T. Effect of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, n. 31, p. 28-33, 1992.

VOELKEL, S. H.; HU, Y.X. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. *Theriogenology*, 37, p. 1117-1131, 1992.

WHITTEN, W. K. Culture of tubal ova. *Nature*, n. 179, p. 1081-1082, 1957.

WRIGHT, R. W. Jr. Successful culture *in vitro* of swine embryos to the blastocysts stage. *J. Anim. Sci.*, n. 44, p. 854-858, 1977.

WRIGHT, R. W. Jr., ANDERSON G. B., CUPPS P. T., DROST M., BRADFORD, G. E. *In vitro* culture of embryos from adult and prepuberal ewes. *J. Anim. Sci.*, n. 42, p. 912-917, 1976.

XU, K. P.; GREVE, T.; SMITH S.; HYTTEL, P. (1986 b) Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation *in vitro*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 27, n. 4, p. 505-519, 1986 b.

XU, X. J.; YANG, Q. Z.; QIAN, R. C.; NAKAHARA, Z.; BETTERIDGE, K.J.; KING, W. A. Development of *in vitro* fertilized bovine ova in two co-culture systems. In: PROCEEDINGS OF THE TWELFTH INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION (THE HAGUE), 3., p.1372-1374, 1992 b.

XU, K.P.; GREVE, T. Early events of *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Egg and embryo technologies to domestic animals (Copenhagen), p. 36-40, 1987.

YANG B. K., YANG X., FOOT R.H. Early development of IVM/ IVF bovine embryos cultured with or without somatic cells in a simple serum-free medium with different concentrations of CO₂ and O₂. *J. Reprod. Dev.* n. 40, p. 197-202, 1994.

YOUNIS, A. I.; BRACKETT, B. G.; FAYRER-HOSKEN R. A. Influence of serum hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Research*, n. 23, p. 189-201, 1989 b.