



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR**

**AVALIAÇÃO DE UMA SOLUÇÃO DE ÁGUA DE COCO (*Cocos
nucifera*) SUPLEMENTADA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES BOVINOS**

Aluna: Marcela da Silva Cordeiro
Orientador: Otávio Mitio Ohashi

Belém-PA
2011

MARCELA DA SILVA CORDEIRO

**AVALIAÇÃO DE UMA SOLUÇÃO DE ÁGUA DE COCO (*Cocos nucifera*)
SUPLEMENTADA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Neurociência e Biologia Celular.
Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi

Belém, 01 de Dezembro de 2011

MARCELA DA SILVA CORDEIRO

**AVALIAÇÃO DE UMA SOLUÇÃO DE ÁGUA DE COCO (*Cocos nucifera*)
SUPLEMENTADA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Neurociência e Biologia Celular.
Área de concentração: Biologia Celular

Data: 01/12/2011

Banca Examinadora

Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA
(Orientador)

Prof^a. Dr. André Salim Khayat
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Prof. Dr. Moysés dos Santos Miranda
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Prof^a. Dr^a. Simone do S. D. Santos
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Belém-PA

DEDICO

Aos meus pais ***LUIZ BRAZ CORDEIRO*** (*In memoriam*) e ***MARIA RAIMUNDA DA SILVA CORDEIRO*** em retribuição ao amor, carinho, cuidado e dedicação.

DEDICO

Aos meus irmãos, sobrinhos, primos e familiares, por acreditarem no meu trabalho e sempre me apoiarem. Muito obriga pelo incentivo e cuidado.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Pará que através do Curso de Pós-Graduação foi a responsável por minha formação acadêmica e profissional.

Aos coordenadores e secretários do Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular pela responsabilidade e dedicação ao curso.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará pelo suporte financeiro.

A Universidade Norte do Paraná pelo suporte financeiro.

Ao matadouro frigorífico SOCIPE pelo fornecimento do material biológico.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa – Amazônia Oriental) pela concessão dos frutos.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário-PA pela avaliação físico-química da água de coco.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Sem dúvida esta é a parte mais importante deste trabalho, por ser um espaço reservado ao sentimento mais belo que um ser humano pode ter pelo outro que é a Gratidão.

Agradeço a Deus pelo dom da vida e assim ter permitido a realização de mais um sonho.

Agradeço de coração a pessoa que mais me incentivou e que sempre acreditou e confiou em meu trabalho. Muito obrigada pela dedicação, apoio, ensinamentos e, principalmente, pela enorme paciência. Saiba que tenho imensa admiração por seu caráter, honestidade, respeito ao próximo e por você ser a pessoa mais humana e humildade que já conheci. Minha eterna gratidão ao meu querido orientador Prof. Dr. OTÁVIO MITIO OHASHI.

Aos membros da banca Prof. Dr. André Salim Khayat, Prof. Dr. Moysés dos Santos Miranda e a Profa. Dra. Simone do Socorro Damasceno Santos, pela disponibilidade e gentileza em aceitar o convite. Muito obrigada pelas valiosas e indispensáveis sugestões.

A minha irmã de coração Profa. Nathália Nogueira da Costa, por ter contribuído imensamente na construção dessa tese e, principalmente, por ter sido amiga e companheira em todos os momentos ao longo desses vários anos de laboratório. O convívio com você me ensinou o verdadeiro valor de uma amizade. Muito, muito, muito obrigada por tudo.

Ao Prof. Thiago Velasco Guimarães da Silva pela inestimável amizade, carinho e, principalmente, pela enorme paciência. Muito obrigada pelo apoio e auxílio em todos os momentos que precisei.

A amiga Priscilla Ramos por ter se empenhado em me ajudar nas análises bioquímicas da água de coco. Saiba que sua ajuda foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada por tudo.

Aos técnicos do laboratório Ronald Reis, Artur e Renato Silva, responsáveis pela coleta do material no abatedouro.

Aos colegas do Laboratório de Fecundação *In vitro* da UFPA Adriel Brito, **André Sá**, Bruno Baraúna, Davi Santos, Jullianne Lima, Leonardo **Araújo**, Priscila Santana e Stefanne Conceição, Veluma Correa pelo apoio e agradável convívio.

Aos colegas de trabalho do IFPA-*campus* Abaetetuba, especialmente aos professores Eurico Fontes e Augusto Sousa pela enorme compreensão e apoio, muito obrigada!

Em fim, a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho o meu muito, muito, muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xvii
 CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA.....	 01
1 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS.....	02
1.1 MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> (MIV) DOS COMPLEXOS <i>CUMULUS</i> OÓCITO (CCOs).....	04
1.2 FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV).....	06
1.3 CULTIVO <i>IN VITRO</i> (CIV) DE EMBRIÕES.....	08
2 ÁGUA DE COCO COMO MEIO DE PRESERVAÇÃO E CULTIVO CELULAR EM BIOTECNOLOGIAS REPRODUTIVAS.....	11
 CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DE UMA SOLUÇÃO DE ÁGUA DE COCO A 75% SUPLEMENTADA COM MYO-INOSITOL, TRI-CITRATO DE SÓDIO E AMINOÁCIDOS DURANTE A MATURAÇÃO OOCITÁRIA E CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS <i>IN VITRO</i>.....	 14
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 HIPÓTESE.....	18
1.2 OBJETIVO.....	19
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.1 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	20
2.1.1 Composição da solução de água de coco a 75% suplementada com mio-inositol, tri-citrato de sódio e aminoácidos (SAC-75S).....	20
2.1.2 Obtenção dos Ovários.....	21
2.1.3 Recuperação e Seleção dos Complexos <i>Cumulus</i> -Oócito (CCOs)..	21
2.1.4 Maturação <i>In Vitro</i>	22
2.1.5 Fecundação <i>In Vitro</i>	23
2.1.6 Cultivo <i>In Vitro</i> dos Embriões.....	24
2.1.7 Delineamento Experimental.....	24
2.1.8 Avaliação Quantitativa do Desenvolvimento Embrionário <i>In Vitro</i> ..	25
2.1.9 Análise Estatística.....	26
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4 CONCLUSÕES.....	29
 CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO QUÍMICA DA ÁGUA DE COCO <i>IN NATURA</i> EM COMPARAÇÃO COM O MEIO 199.....	 30
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	33
1 INTRODUÇÃO.....	35
1.1 HIPÓTESE.....	36

1.2 OBJETIVOS.....	36
1.2.1 Objetivo Geral.....	36
1.2.2 Objetivos Específicos.....	36
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1 OBTENÇÃO DOS FRUTOS E MENSURAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DA ÁGUA DE COCO <i>IN NATURA</i>	37
2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	40
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4 CONCLUSÕES.....	49

CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DE UMA SOLUÇÃO DE ÁGUA DE COCO A 20% NO CULTIVO DE CÉLULAS DO CUMULUS OOPHORUS Bovino.....	50
RESUMO.....	51
ABSTRACT.....	52
1 INTRODUÇÃO.....	53
1.1 HIPÓTESE.....	53
1.2 OBJETIVOS.....	54
1.2.1 Objetivo Geral.....	54
1.2.2 Objetivos Específicos.....	54
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DE UMA SOLUÇÃO DE ÁGUA DE COCO A 20% (SBAC-20) NO CULTIVO DE BIÓPSIAS DE CÉLULAS DO CUMULUS OOPHORUS IMATURAS.....	55
2.1.1 Composição dos Meios de Cultivo Celular.....	55
2.1.2 Obtenção de Biópsias de Células do <i>Cumulus Oophorus</i> Imaturas.....	56
2.1.3 Delineamento Experimental.....	57
2.1.4 Avaliação do Crescimento Celular.....	58
2.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DE UMA SOLUÇÃO DE ÁGUA DE COCO A 20% SUPLEMENTADA COM MYO-INOSITOL, TRICITRATO E AMINOÁCIDOS (SBAC-20S) NO CULTIVO MONOCAMADA DE CÉLULAS DO CUMULUS OOPHORUS MATURAS.....	58
2.2.1 Composição dos Meios de Cultivo Celular.....	58
2.2.2 Obtenção da Monocamada de Células do <i>Cumulus Oophorus</i> Maturas.....	59
2.2.3 Delineamento do Experimental.....	59
2.2.4 Avaliação do Crescimento Celular.....	60
3 RESULTADOS.....	61
3.1 EXPERIMENTO 1.....	61
3.2 EXPERIMENTO 2.....	64
4 CONCLUSÕES.....	67

CAPÍTULO 5: AVALIAÇÃO DE UMA SOLUÇÃO DE ÁGUA DE COCO A 20% SUPLEMENTADA COM MYO-INOSITOL, TRI-CITRATO DE SÓDIO E AMINOÁCIDOS NA MATURAÇÃO OOCITÁRIA, FECUNDAÇÃO E CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS IN VITRO.....	68
RESUMO.....	69
ABSTRACT.....	70

1 INTRODUÇÃO.....	71
1.1 HIPÓTESE.....	72
1.2 OBJETIVOS.....	72
1.2.1 Objetivo Geral.....	72
1.2.2 Objetivos Específicos.....	72
2 MATERIAL E METODOS.....	73
2.1 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	73
2.1.1 Maturação <i>In Vitro</i>	73
2.1.2 Fecundação <i>In Vitro</i>	73
2.1.3 Cultivo <i>In Vitro</i> dos Embriões.....	74
2.1.4 Delineamento Experimental.....	75
2.1.5 Avaliação da Fecundação <i>In Vitro</i>	76
2.1.6 Avaliação do Desenvolvimento Embrionário <i>In Vitro</i>	77
2.1.7 Análise Estatística.....	80
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
3.1 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i>	81
3.2 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO <i>IN VITRO</i>	84
4 CONCLUSÕES.....	92
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
ANEXOS.....	126

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
®	Marca Registrada
<	Menor
>	Maior
±	Mais ou menos
ACIN	Água de coco <i>In Natura</i>
ACP®	Água de Coco em Pó
ACP - 312®	Água de Coco em Pó formulado para a espécie suína
ANOVA	Análise de variância
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina Sérica Bovino)
BMP4	<i>Bone Morphogenetic Protein 4</i> (Proteína Morfogenética Óssea 4)
CCOs	Complexos <i>Cumulus</i> -Oócito
CG	Células da Granulosa
CIV	Cultivo <i>In Vitro</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
eCG	(Gonadotrofina Coriônica Equina)
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Fator de crescimento Epidérmico)
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
<i>et al</i>	<i>et alli</i> (e colaboradores)

FGF 10	<i>Fibroblastic Growth Factor 10</i> (Fator de Crescimento Fibroblástico 10)
FIV	Fecundação <i>In Vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
<i>g</i>	Gravidade
GSH	Glutathiona
h	Horas
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
Hepes	<i>N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid</i>
IAA	<i>Indol Acetic Acid</i> (Ácido 3-Indol-Acético)
IETS	<i>International Embryo Transfer Society</i> (Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões)
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Semelhante à insulina)
ITS	Insulina-Transferrina-Selênio
LH	Hormônio Luteinizante
M II	Metáfase II
mg	Miligrama
MIV	Maturação <i>In Vitro</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro

MOET	<i>Multiple Ovulation and Embryo Transfer</i> (Ovulação Múltipla e Transferência de Embrião)
mOsmol/L	Miliosmol/Litro
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetros
μM	Micromolar
O ₂	Oxigênio
OPU	<i>Ovum pick-up</i>
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i> (Fator de crescimento derivado de plaquetas)
PIVE	Produção <i>In Vitro</i> de Embriões
RNA	Ácido Ribonucléico
SAC-75	Solução de Água de Coco com 75% de água de coco <i>in natura</i>
SAC-20	Solução de Água de Coco com 20% de água de coco <i>in natura</i>
SAC-20S	Solução de Água de Coco com 20% de água de coco <i>in natura</i> suplementada
SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	<i>Synthetic Oviduct Fluid</i> (Fluido Sintético de Oviduto)
SPTZ	Espermatozóide
SPTZ/mL	Espermatozóide/mililitro
TALP	Tyrode's, Albumina, Lactato e Piruvato

TCM	<i>Tissue Culture Medium</i> (Meio de Cultivo de Tecidos)
v/v	Volume a volume

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Fotomicrografia de embriões bovinos: A- embriões com duas ou mais células no segundo dia de cultivo (150X); B- embrião em estágio de blastocisto no sétimo dia de cultivo *in vitro* (600X)..... 26
- Figura 2:** *Cocos nucifera* com frutos em vários estádios do desenvolvimento. Cachos com aproximadamente 1 (seta branca) e 2 meses (seta vermelha)..... 38
- Figura 3:** Valores de pH aos 3, 4 e 5 meses de maturação do fruto; ^{a,b,c} Sobrescritos diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$); F= Filtrado; NF= Não filtrado..... 42
- Figura 4:** Concentração de glicose aos 3, 4 e 5 meses de maturação do fruto; ^{a,b,c,d} Sobrescritos diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$); F= Filtrado; NF= Não filtrado 42
- Figura 5:** Concentração de proteína aos 3, 4 e 5 meses de maturação do fruto; ^{a,b,c,d,e,f} Sobrescritos diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$); F= Filtrado; NF= Não filtrado..... 44
- Figura 6:** Concentração de potássio aos 3, 4 e 5 meses de maturação do fruto; ^{a,b,c} Sobrescritos diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$); F= Filtrado; NF= Não filtrado..... 44
- Figura 7:** Concentração de cálcio aos 3, 4 e 5 meses de maturação do fruto; ^{a,b,c,d} Sobrescritos diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$); F= Filtrado; NF= Não filtrado..... 46
- Figura 8:** Concentração de magnésio aos 3, 4 e 5 meses de maturação do fruto; ^{a,b,c,d} Sobrescritos diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$); F= Filtrado; NF= Não filtrado..... 46

Figura 9:	Concentração de sódio aos 3, 4 e 5 meses de maturação do fruto; ^{a,b,c,d} Sobrescritos diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$); F= Filtrado; NF= Não filtrado.....	47
Figura 10:	Concentração de cloreto aos 3, 4 e 5 meses de maturação do fruto; F= Filtrado; NF= Não filtrado.....	47
Figura 11:	Concentração de ferro aos 3, 4 e 5 meses de maturação do fruto; ^{a,b,c} Sobrescritos diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$); F= Filtrado; NF= Não filtrado.....	48
Figura 12:	Valores de osmolaridade aos 3, 4 e 5 meses de maturação do fruto; ^{a,b,c} Sobrescritos diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$); F= Filtrado; NF= Não filtrado.....	48
Figura 13:	Fotomicrografia demonstrando o método de obtenção das biópsias de células do <i>cumulus oophorus</i> (seta) através do corte com auxílio da extremidade do tubo capilar de vidro (120X).....	56
Figura 14:	Fotomicrografia de CCOs bovinos e suas respectivas biópsias de células do cumulus oophorus (setas brancas) (60X).....	57
Figura 15:	Placa de MIV demonstrando o sistema de cultivo em gotas de 100 μ L de meio sob óleo mineral (A). Na imagem B, fotomicrografia da monocamada de células do <i>cumulus oophorus</i> que aderiram à placa durante o processo de MIV dos CCOs (100X).....	60
Figura 16:	Fotomicrografia de biópsia de <i>cumulus oophorus</i> aderida a placa no segundo dia de cultivo em Meio 199 (130X).....	62
Figura 17:	Fotomicrografia de biópsia de <i>cumulus oophorus</i> no segundo dia de cultivo em SBAC-20, observar adesão e crescimento celular aparentemente normal (140X).....	62

- Figura 18:** Fotomicrografia de células do *cumulus oophorus* no quarto dia de cultivo em Meio 199, apresentando características morfológicas e de multiplicação celular padrão para o tipo e condição de cultivo celular (140X)..... 63
- Figura 19:** Fotomicrografia de células do *cumulus oophorus* mostrando a perda de adesão celular a partir do quarto dia de cultivo em SBAC-20, (130X)..... 63
- Figura 20:** Fotomicrografia de células do *cumulus oophorus* no oitavo dia de cultivo em SBAC-20. Observar o descolamento total e fragmentação celular (130X)..... 64
- Figura 21:** Micrografia da monocamada de células do *cumulus oophorus* no primeiro dia de cultivo em SBAC-20S. Observar a baixa densidade celular, comum ao início de cultivo, sob microscopia óptica de luz (A) e fluorescência (B) (100X)..... 65
- Figura 22:** Fotomicrografia da monocamada de células do *cumulus oophorus* no sétimo dia de cultivo em SBAC-20S. Na imagem A (400X) podemos observar os eventos de citocinese (setas) indicando a ocorrência de multiplicação celular, comprovado pelo estado de confluência, com ocupação de 80% da superfície da placa, e quantidade de núcleos celulares marcados com fluorocromo hoechst (B e C – 120X)..... 66
- Figura 23:** Fotomicrografia de zigotos bovinos após 16h de fecundação corados com orceína 1% para análise da formação pró-nuclear. Nas imagens A (400X) e B (1000X) são observados dois e três pró-núcleos, respectivamente..... 76
- Figura 24:** Fotomicrografia de embriões bovinos em diferentes estágios do desenvolvimento (blastocisto (BL), blastocisto expandido (BX) e blastocisto eclodido (BE) no sétimo dia de cultivo *in vitro*..... 77

- Figura 25:** Fotomicrografia de oócito bovino corado com orceína 1%, em estágio de metáfase II, onde podemos observar placa metafásica (seta branca) e primeiro corpúsculo polar (seta preta), após 16h de fecundação em SAC-20S (1000X)..... 83
- Figura 26:** Fotomicrografia da gota fecundação (32h) demonstrando na imagem A (100X) as células do *cumulus oophorus* aderidas à superfície da placa quando submetidas ao processo de FIV em SBAC-20S (Grupo F-Coco), característica esta incomum as condições de fecundação padrão como observado na imagem B (120X) do Grupo Controle..... 83
- Figura 27:** Fotomicrografia do Grupo F-Coco no segundo (A-100X) e sétimo (B-130X) dias de cultivo *in vitro*. Observar ausência de clivagens após FIV em SBAC-20S..... 84
- Figura 28:** Fotomicrografia dos Grupos Controle (A), M-Coco (B), C-SOF (C) no sétimo dia de cultivo (80X)..... 87
- Figura 29:** Fotomicrografia do Grupo C-Coco no segundo (A) e sétimo (B) dias de cultivo. Notar na imagem B que, apesar do crescimento aparentemente normal da monocamada de células do *cumulus oophorus*, houve degeneração dos embriões cultivados em SAC-20S (100X)..... 88
- Figura 30:** Concentração relativa de transcritos para o gene GLUT-1 (média±desvio padrão) nos embriões oriundos de diferentes meios de maturação..... 89
- Figura 31:** Concentração relativa de transcritos para o gene OCT-4 (média±desvio padrão) nos embriões oriundos de diferentes meios de maturação..... 89
- Figura 32:** Concentração relativa de transcritos para o gene IFN- τ (média±desvio padrão) nos embriões oriundos de diferentes meios de maturação. A, B: Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)..... 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Delineamento Experimental.....	25
Tabela 2:	Taxas de clivagem e formação de blastocisto após maturação oocitária e/ou cultivo embrionário em solução a base de água de coco a 75% suplementada com myo-inositol, tri-citrato de sódio e aminoácidos.....	27
Tabela 3:	Delineamento experimental.....	75
Tabela 4:	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação relativa dos genes, o tamanho do fragmento (pares de base) e seu respectivo código de acesso no GenBank.....	79
Tabela 5:	Taxa de formação pró-nuclear (16h) após fecundação em solução à base de água de coco 20% suplementada com myo-inositol, tri-citrato de sódio e aminoácidos.....	82
Tabela 6:	Taxas de clivagem, formação de blastocisto e cinética do desenvolvimento após PIVE em solução à base de água de coco 20% suplementada com myo-inositol, tri-citrato de sódio e aminoácidos (SBAC-20S).....	86

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

A Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE) é uma biotecnologia que apresenta grande importância na compreensão e construção do conhecimento básico sobre mecanismos envolvidos na fisiologia da reprodução e desenvolvimento embrionário (GORDON, 1994). Além de representar uma importante ferramenta nos programas de melhoramento genético em animais de produção (GALLI et al., 2003) e para tecnologias afins como transferência nuclear, transgênese e células tronco (GONÇALVES et al., 2008).

Desde os primeiros relatos de fecundação *in vitro* em bovinos, início dos anos 80, estudos básicos e aplicados em tecnologias de embriões geraram uma vasta literatura sobre os fatores que regulam a qualidade do oócito e desenvolvimento embrionário (LONERGAN, 2007), garantindo significativos avanços no aperfeiçoamento dos meios e condições de cultivo, relacionadas aos processos de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* (BOUSQUET et al., 1999).

Os avanços quantitativos e, principalmente, qualitativos na PIVE aliados a técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultra som (*ovum pick-up* – OPU) (PIETERSE et al., 1991) viabilizaram sua aplicação em escala comercial, tornando-a competitiva em relação a outras biotecnologias, como a transferência de embriões oriundos da técnica de superovulação (*multiple ovulation and embryo transfer*- MOET) (BOUSQUET et al., 1999; GALLI et al., 2003; LEEUW, 2006).

Por este motivo, atualmente a técnica PIVE está em processo de acelerada difusão e desenvolvimento, especialmente na pecuária brasileira, onde, no período de 2000 a 2006, foi registrado um aumento de 1.561% na quantidade

de embriões transferidos contra os 181% oriundos da técnica de MOET, chegando a representar, segundo Viana & Camargo (2007), 75% do total de embriões transferidos em 2006.

Entretanto, um dos grandes desafios dos sistemas de cultivo de embriões é simular uma perfeita condição de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro*, em função da complexidade dos vários ambientes através dos quais os gametas e embriões passam durante o desenvolvimento *in vivo* (MEIRELLES et al., 2004). Apesar dos grandes avanços na PIVE, os mesmos ainda são caracterizados como embriões de baixa qualidade (BOUSQUET et al., 1999; RIZOS et al., 2002a; KEPKOVA et al., 2011), uma vez que estudos revelam grandes diferenças em relação às características morfológicas (CROSIER et al., 2001; FAIR et al., 2001; GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2001; RIZOS et al., 2002c), bioquímicas (ABD EL RAZEK et al., 2000; ENRIGHT et al., 2000) e moleculares em relação aos embriões produzidos *in vivo* (NIEMANN & WRENZYCKI, 2000; RIZOS et al., 2002b; LONERGAN et al., 2003b; CLEMENTE et al., 2011).

Nesse sentido, vários grupos de pesquisa vêm tentando aprimorar as condições e os meios de cultivo visando o aumento de sua eficácia em termos de quantidade e, principalmente, qualidade dos embriões produzidos *in vitro* (BAVISTER, 2000; GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2001; LONERGAN, 2007; LONERGAN & FAIR, 2008; ASHKAR et al., 2009; PERS-KAMCZYC et al., 2010; COSTA, 2010; BERMEJO-ALVAREZ et al., 2011; SAADELDIN et al., 2011).

1.1 MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV) DOS COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITO (CCOs)

O processo de maturação é caracterizado por uma série de modificações ultraestruturais e bioquímicas que envolvem a retomada da primeira divisão meiótica (maturação nuclear) e a redistribuição das organelas celulares, tais como grânulos corticais, mitocôndrias, complexo de golgi e retículo endoplasmático, conhecida como maturação citoplasmática (HYTTEL et al., 1989; WARSSAMAN & ALBERTINI, 1994). A ocorrência desses eventos de forma simultânea e integrada é essencial para que o oócito tenha capacidade de ser fecundado, realizar descondensação do material genético paterno, formar pró-núcleos e promover o desenvolvimento embrionário inicial (EPPIG, 1996; YANG et al., 1998).

Apesar do potencial de formação de blastocisto *in vitro* depender de fatores intrínsecos aos CCOs e que são adquiridos durante o crescimento folicular (LONERGAN et al., 1994a; GANDOLFI et al., 1997; YANG et al., 1998; LEIBFRIED-RUTLEDGE, 1999; KHURANA & NIEMANN, 2000), o desenvolvimento embrionário é fortemente influenciado pelos eventos que ocorrem durante a MIV (BEVERS et al., 1997; SIRARD, 2001), uma vez que CCOs maturados *in vivo* apresentaram melhores taxas de desenvolvimento embrionário (RIZOS et al., 2002a).

Dada a importância da MIV para o potencial de desenvolvimento embrionário, vários autores têm se dedicado a melhoria dessas condições, em função de que apenas 30 a 40% dos CCOs que sofrem maturação *in vitro*

adquirem “competência” para continuar o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (LONERGAN & FAIR, 2008).

Dentre os problemas relacionados às condições de cultivo podemos destacar a dificuldade de simular *in vitro* os mecanismos envolvidos na sinalização intra e extracelular que orquestram o processo de maturação oocitária. Estudos sobre a expressão gênica já identificaram, em oócitos imaturos e maduros, mRNAs para alguns fatores de crescimento bem como para seus receptores (YOSHIDA et al., 1997), revelando a importância dessas moléculas e suas vias de sinalização para o sucesso da maturação.

Vários autores já demonstraram o efeito positivo da adição de fator de crescimento epidérmico (EGF) na MIV em relação às taxas de formação de blastocisto (HARPER & BRACKETT, 1993; KOBAYASHI et al., 1994; LORENZO et al., 1994; LONERGAN et al., 1996; PARK et al., 1997). Resultados semelhantes, também, foram obtidos com a adição de outros fatores como: fator de crescimento derivado de plaquetas – PDGF (HARPER & BRACKETT, 1993), fator de crescimento semelhante à insulina - IGF (LORENZO et al., 1994; GULER et al., 2000), proteína morfogenética óssea 4 - BMP4 (LA ROSA et al., 2011) e fator de crescimento fibroblástico 10 - FGF10 (ZHANG et al., 2010). No entanto, apesar de todos esses estudos a grande maioria dos laboratórios opta por protocolos mais simples (adição de soro fetal bovino-SFB), em função, principalmente, do elevado custo dos fatores de crescimento.

Outro fato importante e comum aos sistemas de cultivo celular *in vitro* é o estresse oxidativo, que embora seja importante para alguns processos fisiológicos, como o próprio mecanismo de FIV (ALI et al., 2003), sabe-se que o desequilíbrio nos sistemas de controle das espécies reativas de oxigênio (ERO)

pode acarretar em prejuízo para a PIVE, refletindo em menor quantidade e qualidade dos embriões (GUÉRIN et al., 2001).

Nesse sentido, a adição de substâncias como β -mercaptoetanol, cisteína e cistina que estimulam a síntese de glutathione (GSH), um importante antioxidante intracelular (MATOS & FURNUS, 2000), e antioxidantes como catalase e superóxido dismutase (ALI et al., 2003) tem revelado efeitos positivos na tentativa de minimizar a produção e o efeito deletérios das ERO durante a MIV.

1.2 FECUNDAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

A FIV é um processo complexo que depende de uma maturação oocitária bem sucedida, bem como de um processo de capacitação espermática adequada que permita a ocorrência de reação acrossômica para que o espermatozóide penetre a zona pelúcida e possa se fundir com a membrana plasmática do oócito (MENDES et al., 2003). Para isso o espermatozóide (SPTZ) precisa sofrer uma seqüência de modificações bioquímicas e ultraestruturais, que normalmente ocorrem no trato reprodutivo feminino e que fazem parte da fase final da maturação pós-testicular, conhecida como capacitação espermática (YANAGIMACHI, 1994; HAFEZ & HAFEZ, 2004).

A capacitação espermática *in vivo* é induzida por fatores presentes no trato feminino, com destaque para as glicosaminoglicanas, em especial a heparina que, normalmente, é utilizada para induzir a capacitação *in vitro* (PARRISH et al., 1988). Entretanto, os mecanismos de ação da heparina não foram completamente

elucidados, exigindo a determinação, inclusive da concentração ideal para cada animal e que em bovinos varia de 2 a 100 µg/mL (GONÇALVES et al., 2008).

Em função da facilidade de manipulação, a maioria das tecnologias ligada ao sêmen envolvem apenas o aperfeiçoamento dos protocolos de lavagem e separação dos SPTZ viáveis (PARRISH et al., 1995; MENDES et al., 2003; CESARI et al., 2006; LEE et al., 2009; THYS et al., 2009), bem como dos métodos de criopreservação (AWAD, 2011; BUCAK et al., 2011; HU et al., 2011) e sexagem espermática (IWASAKI et al., 1988; RESENDE, 2007; CURRY et al., 2009; CARVALHO et al., 2010).

A falta de estudos em relação à real importância do gameta masculino no processo de fecundação e no potencial de desenvolvimento embrionário é comprovada pela pouca evolução das condições de fecundação que, até hoje, envolvem o uso do meio Tyrode's com Albumina, Lactato e Piruvato, descrito por Bavister & Yanagimachi (1977), suplementado com BSA, heparina, como agente capacitante e PHE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina) como estimuladores do metabolismo espermático (PARRISH et al., 1988).

Entretanto, estudos recentes têm dado mais atenção para o processo de capacitação espermática, principalmente em função da elevada variabilidade na taxa de fecundação *in vitro* associada ao fator touro (SHI et al., 1990, YANG et al., 1995).

Nesse sentido, algumas substâncias têm sido avaliadas, como a osteopontina, uma proteína presente em vários tecidos incluindo sistema reprodutor (JOHNSON et al., 1999 e LUEDTKE et al., 2002) e que pode apresentar importante função na reprodução, por estar presente no fluído do oviduto (KILLIAN, 2004; GABLER et al., 2003) e em maior quantidade no plasma

seminal de animais com alta fertilidade (CANCEL et al., 1997). Apesar de Monaco et al. (2009) demonstrarem a influencia positiva na capacitação e na eficiência da PIVE, a falta de mais estudos e o elevado custo da osteopontina, atualmente, inviabilizam sua adição aos meios de FIV.

Outra substância que vem apresentando importantes resultados na indução da capacitação e reação acrossômica em algumas espécies de mamíferos como suínos (FUNAHASHI, 2002), búfalos (ROY & ATREJA, 2008) e bovinos é a L-arginina (O'FLAHERTY et al., 2004; SILVA, 2010), cuja ação está relacionada à produção do óxido nítrico (ON), uma vez que a L-arginina serve de substrato para a enzima óxido nítrico sintase (MONCADA & HIGGS, 1993).

O ON é um potente sinalizador celular observado em uma grande variedade de tipos celulares, inclusive nos relacionados a reprodução (MARLETTA, 1993; HERRERO et al., 1994; O'BRYAN et al., 1998; LEAL et al., 2009) e que nesse caso parece estar envolvido na ativação de proteínas quinases que coordenam a sequência de eventos que culmina na reação acrossômica (RODRIGUEZ et al., 2005).

1.3 CULTIVO *IN VITRO* (CIV) DE EMBRIÕES

Durante o cultivo *in vitro*, os embriões passam por eventos significativos como iniciação e continuação da clivagem, ativação do genoma embrionário, agregação e compactação dos blastômeros, diferenciação em trofoblasto e massa celular interna, formação e expansão da blastocle e rompimento da zona

pelúcida (GONÇALVES et al., 2008). Apesar de todos esses eventos dependerem, em grande parte, do potencial de desenvolvimento do oócito (GANDOLFI et al., 1997) o CIV representa uma etapa muito importante por exercer forte influência na qualidade do blastocisto em termos de criotolerância, padrão de expressão gênica e habilidade para estabelecer prenhez (ABE et al., 2002; RIZOS et al., 2002a; LONERGAN et al., 2006).

Na busca de condições mais adequadas para o desenvolvimento pré-implantacional, diversos aspectos dos sistemas e condições de cultivo *in vitro* vem sendo amplamente estudado como, volume e quantidade de embriões por gota (O'DOHERTY et al., 1997; HENDRIKSEN et al., 1999; DE OLIVEIRA et al., 2005; NAGAO et al., 2008), uso de antioxidante (ALI et al., 2003; BAIN et al., 2011), tensão de O₂ (KHURANA et al., 2000; BAIN et al., 2011, MINGOTI et al., 2011), adição de fatores de crescimento (FLOOD et al., 1993; THIBODEAUX, et al., 1993; TERUEL & SMITH, 1997), hormônios (PERS-KAMCZYC et al., 2010, LARSON, et al., 2011) e até mesmo a utilização de sistemas de cultivo com a possibilidade de alterações das características físico-químicas dos meios ao longo do processo de PIVE conhecido como sistema de cultivo dinâmico (BEEBE et al., 2002).

Grande parte dos protocolos de CIV envolve co-cultivo de embriões com células somáticas (GALLI & MOOR, 1989; GOOVAERTS et al., 2009), que segundo DONNAY et al. (1997) podem contribuir para o desenvolvimento embrionário pela produção de fatores embriotróficos (fatores de crescimento, citocinas, antioxidantes) e pela neutralização de componentes embriotóxicos (radicais livres, metabólitos embrionários e celulares, íons de amônia e outros). Embora o sistema de co-cultivo seja efetivo e eleito para o cultivo de embriões

produzidos em estufas com atmosfera sem controle de O₂, resultados relevantes com relação às taxas de blastocisto e qualidade embrionária foram obtidos com o cultivo embrionário sob baixa tensão de O₂, sem monocamada e com redução na quantidade de SFB (LONERGAN et al., 1999; ALI et al., 2003; YUAN et al., 2003; RIZOS et al., 2003).

Um ponto importante, que não podemos deixar de citar é a busca pelo estabelecimento de meios quimicamente definidos, uma vez que a utilização de substâncias de origem biológica oferece riscos de contaminação para a amostra, dificultando, por questões sanitárias, a própria comercialização dos embriões (HOLM & CALLESEN, 1998; STRINGFELLOW & SEIDEL 1999). Nesse sentido, vários trabalhos vêm tentando substituir o SFB e BSA, por substâncias sintéticas como Polivinil álcool (PVA), Polivinil pirrolidone (PVP) e Ficoll (MINGOTI et al., 2011; MOMOZAWA et al., 2011), entretanto, na grande maioria das vezes os resultados são inferiores aos obtidos com meios convencionais.

Embora os meios de cultivo embrionário tenham sido desenvolvidos com base nos fluidos do útero e do oviduto durante o início da gestação, como é o caso do meio Fluido Sintético de Oviduto (SOF) desenvolvido por Tervit et al. (1972), os embriões ainda sofrem forte influências das condições artificiais em que são mantidos durante o desenvolvimento pré-implantacional, cujo reflexo é nítido no padrão de expressão gênica (RIZOS et al., 2002b; LONERGAN et al., 2003b, 2006; BALASUBRAMANIAN et al., 2007; PURPERA et al., 2009; SAADELDIN et al., 2011). Nesse contexto, estudos moleculares vêm tornando-se uma ferramenta indispensável na construção do conhecimento sobre a fisiologia básica do embrião e, conseqüentemente, na avaliação qualitativa dos protocolos de PIVE.

2. ÁGUA DE COCO COMO MEIO DE PRESERVAÇÃO E CULTIVO CELULAR EM BIOTECNOLOGIAS REPRODUTIVAS

Devido sua composição rica em sais minerais, proteínas, carboidratos, vitaminas e indutores da divisão celular (fitohormônios) (NUNES & COMBARNOUS, 1995; SANTOSO et al., 1996; SILVA et al. 2009) a água de coco, há alguns anos, vem sendo empregada com sucesso dentro das biotecnologias reprodutivas, principalmente, como diluente de sêmen de várias espécies como suínos (TONIOLLI & MESQUITA, 1990; BARROS, 2010), caprinos e ovinos (ARAÚJO & NUNES, 1990; NUNES, 1997; NUNES & SALGUEIRO, 1999), bubalinos (VALE et al., 1999), peixes (FARIAS et al., 1999), cães (UCHOA et al., 2002, 2003; CARDOSO et al., 2003, 2005, 2006), felinos (SILVA et al. 2007), primatas (ARAÚJO et al., 2009) e até mesmo humanos (NUNES, 1998).

O grande sucesso da água de coco em promover maior viabilidade aos espermatozóides incentivou sua utilização na preservação de outros tipos celulares como folículos ovarianos pré-antrais *in situ* de caprinos (SILVA et al., 1999; SILVA et al., 2000; COSTA et al., 2002), ovinos (ANDRADE et al., 2002; COSTA et al., 2006) e bovinos (LUCCI et al., 2004).

Quando os meios de cultivo empregados na ativação e crescimento de folículos ovarianos primordiais foram suplementados com água de coco *in natura* (ACIN) em diferentes proporções os resultados foram controversos. Em caprinos, segundo Silva et al. (2004), as taxas de degeneração foram significativas apenas quando foi utilizado ACIN. Enquanto, Martins et al. (2005), relataram redução significativa na sobrevivência com suplementações acima de 10%. Em ovinos foi

observado redução na sobrevivência quando os meios de cultivo foram suplementados com concentrações acima de 20% (COSTA et al., 2006), sendo que em nenhuma das abordagens, a adição de água de coco mostrou resultado superior a condição controle.

A utilização da água de coco na PIVE de bovinos foi relatada por Blume et al. (1997a,b) que demonstraram a possibilidade de utilização da ACIN ou água de coco estabilizada (duas partes de ACIN + uma parte de tampão citrato à 5% + uma parte de água ultra pura; pH=7.3; 310 mOsmol/L) como meio de maturação e cultivo *in vitro* de embriões. Resultados positivos também foram descritos por Cordeiro et al. (2006) ao empregarem a água de coco (75% de ACIN + 25% de água ultra-pura + tampão Hepes) como meio de manutenção/transporte dos oócitos por um período de 6h.

O fracionamento da água de coco permitiu o isolamento de um fitohormônio chamado ácido 3-Índol-acético (IAA) que segundo NUNES (1997) é o principal responsável pelos efeitos favoráveis da água de coco, porém o mecanismo molecular de ação do IAA nas células animais ainda não está claro, porém, quando adicionado ao diluidor, prolongou a sobrevivência e aumentou a motilidade espermática, incrementando as taxas de fertilidade de animais domésticos como ovinos (CRUZ, 1994), suínos (TONIOLLI et al., 1996) e caprinos (NUNES et al., 1996; AZEVÊDO & TONIOLLI, 1999).

Andrade et al. (2005a) utilizaram 40 ng/mL de IAA, concentração esta equivalente a encontrada na ACIN (DUA & CHANDRA, 1993) e obtiveram bons resultados na ativação e crescimento *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais ovinos, principalmente, quando combinado com fator de crescimento epidérmico (EGF) (ANDRADE et al., 2005b).

Em função da ACIN apresentar variações em sua constituição e grande instabilidade físico-química, o que dificulta sua utilização e disponibilização para regiões onde o fruto não existe, foram realizados vários estudos visando sua padronização e conservação, sucesso obtido por Nunes e Salgueiro em 2002 com a liofilização da água de coco sob a forma de pó (ACP® - ACP Biotecnologia, Brasil) (NUNES & SALGUEIRO, 2008).

A ACP®, após reconstituição em água foi testada como diluente de sêmen de caprino (SALGUEIRO et al., 2002) e manteve os mesmos resultados que a ACIN. Resultados positivos, também, foram obtidos com a ACP® em sêmen de cães (SILVA et al., 2006; MADEIRA, 2007; CARDOSO et al., 2007; BARBOSA et al., 2009; MOTA FILHO, 2009), peixes (VIVEIROS et al., 2007; PESSOA, 2009; MELO, 2010), felinos (SILVA et al., 2007) e suínos (BARROS, 2010).

Com base na literatura descrita anteriormente percebe-se que, apesar dos grandes avanços, ainda existe muito a ser feito em relação aos meios e condições de cultivo empregados na PIVE. Sendo assim, pelas propriedades que a água de coco apresenta, faz-se necessário avaliar o real potencial de uma solução de água de coco suplementa com mio-inositol, tri-citrato de sódio e aminoácidos em fornecer condições adequadas aos processos de maturação, fecundação e cultivo embrionário *in vitro*.

CAPÍTULO 2

**AVALIAÇÃO DE UMA SOLUÇÃO DE
ÁGUA DE COCO A 75% SUPLEMENTADA
COM MIO-INOSITOL, TRI-CITRATO DE
SÓDIO E AMINOÁCIDOS DURANTE A
MATURAÇÃO OOCITÁRIA E/OU CULTIVO
DE EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO***

RESUMO

O objetivo deste capítulo foi avaliar uma solução composta por 75% de água de coco *in natura* suplementada com mio-inositol, tri-citrato de sódio e aminoácidos (SAC-75S) durante os processos de maturação oocitária e cultivo embrionário *in vitro*. Para isso CCOs obtidos de ovários oriundos de abatedouro foram selecionados e distribuídos aleatoriamente entre os seguintes Grupos experimentais: Controle, representado pela maturação em Meio 199 e cultivo embrionário em meio SOF; M-Coco, maturação em SAC-75S e cultivo em SOF; C-Coco, maturação em Meio 199 e cultivo em SAC-75S e o MC-Coco, maturação e cultivo embrionário em SAC-75S. A fecundação *in vitro* foi realizada com o sêmen de um único touro (*Bos taurus taurus*), cujo método de separação espermática foi o gradiente de densidade descontínuo de Percoll, sendo a concentração espermática ajustada para 2×10^6 SPTZ/mL. As taxas de clivagem e blastocisto foram submetidas à ANOVA (pós-teste Bonferroni, nível de significância 5%). Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) em relação às taxas de clivagem entre os grupos experimentais. No entanto, em relação à formação de blastocisto houve redução no Grupo M-Coco ($21,66 \pm 8,33\%$) em comparação ao Grupo Controle ($46,66 \pm 8,33$), sendo que nos Grupos C-Coco (0%) e MC-Coco (0%) não houve desenvolvimento embrionário. Portanto, a SAC-75S quando utilizada na MIV não foi eficiente em promover competência oocitária para dar suporte à formação de blastocisto adequadamente e quando empregada na CIV inviabilizou o desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

The purpose of this chapter was to evaluate a solution composed of 75% of *in nature* coconut water supplemented with myo-inositol, tri-sodium citrate and amino acids (SAC-75S) during the process of oocyte maturation and embryo culture *in vitro*. For this COCs obtained from ovaries get at slaughterhouse were randomly selected and distributed among the following groups: control, represented by the oocyte maturation in medium 199 and embryo cultivated in SOF medium, M-Coco, oocyte maturation in SAC-75S and embryo cultivated in SOF, C -Coco, oocyte maturation in Medium 199 and cultivated in SAC-75S and MC-Coco, maturation and embryo culture in SAC-75S. In vitro fertilization was performed with the semen of one bull (*Bos taurus taurus*), whose method of sperm separation was the density gradient of Percoll and the sperm concentration adjusted to 2×10^6 SPTZ/mL. The cleavage and blastocyst rates were submitted to ANOVA (Bonferroni post-test, significance level 5%). There was no statistical difference ($p > 0.05$) compared to the rates of cleavage between the experimental groups. However, in relation to blastocyst formation it was reduced in Group M-Coco ($21.66 \pm 8.33\%$) compared to the control group (46.66 ± 8.33), while in the Groups C-Coco (0%) and MC-Coco (0%) there was no embryonic development. Therefore, the SAC-75S when used in IVM was not effective in promoting oocyte competence to support blastocyst formation and when such solution was used in the CIV it impaired the embryonic development.

1 INTRODUÇÃO

A PIVE, em bovinos, envolve três etapas bastantes distintas conhecidas como maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo embrionário *in vitro* (CIV). Apesar dos inúmeros trabalhos que visam estabelecer meios de cultivo mais adequados (LIM et al., 1994; TAKAHASHI et al., 1998; KRISHER & BAVISTER, 1998; MATOS & FURNUS, 2000; LONERGAN et al., 1999; ALI et al., 2003; RIZOS et al., 2003; GILARDI et al., 2004; MONACO et al., 2009; ARIAS-ALVAREZA et al., 2011; MINGOTI et al., 2011), os protocolos atuais não ultrapassam as taxas de 30 a 40% de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (LEQUARRE et al., 2003, LONERGAN & FAIR, 2008; RIZOS et al., 2008).

Atualmente, os meios mais utilizados nas etapas de MIV, FIV e CIV são, respectivamente, o Meio 199 suplementado com hormônios segundo Lonergan et al. (1994b), o Meio TALP (BAVISTER & YANAGIMACHI, 1977) suplementado com heparina segundo Parrish et al. (1988) e o SOF (TERVIT et al. (1972) suplementado com aminoácidos segundo Holm et al. (1999).

Na busca por meios alternativos, Blume et al. (1997a, 1997b) demonstraram a possibilidade de utilização da água de coco, suplementada com soro fetal bovino (SFB), na PIVE com resultados de clivagem, após maturação, de 45,6% *versus* 51,6% do Grupo Controle e taxa de formação de blastocisto, após cultivo embrionário em solução a base de água de coco, de 23,2% *versus* 34% do Grupo Controle.

Entretanto, apesar dos resultados positivos, as taxas de clivagem e formação de blastocisto foram inferiores as obtidas com os protocolos atuais. Estes resultados podem estar relacionados à carência, na solução à base de água de coco utilizada por estes autores, de alguns aditivos importantes para o metabolismo dos gametas/embriões, uma vez que já foi demonstrada a importância de fatores embriotróficos como mio-inositol, tri-citrato de sódio e aminoácidos nas altas taxas de desenvolvimento embrionário (TAKAHASHI & FIRST, 1992; LEE & FUKUI, 1996; PINYOPUMMINTR & BAVISTER, 1996a; HOLM et al., 1999; LANE, 2001).

Sendo assim, a proposta deste experimento foi avaliar durante os processos de MIV e CIV uma solução a base de água de coco a 75% suplementada com mio-inositol, tri-citrato de sódio e aminoácidos visando alcançar os resultados atuais, obtidos com os meios convencionais, e assim viabilizar a água de coco como um meio alternativo e de baixo custo para PIVE.

1.1 HIPÓTESE

A solução de água de coco a 75% suplementada com mio-inositol, tri-citrato de sódio e aminoácidos é eficiente na maturação oocitária e/ou cultivo *in vitro* de embriões bovinos quanto os meios atuais.

1.2 OBJETIVO

Avaliar a água de coco a 75% suplementada com mio-inositol, tri-citrato de sódio e aminoácidos como meio de maturação oocitária e/ou cultivo *in vitro* de embriões bovinos através das taxas de clivagem e formação de blastocistos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

2.1.1 Composição da solução de água de coco a 75% suplementada com mio-inositol, tri-citrato de sódio e aminoácidos (SAC-75S)

A SAC-75S foi composta por 75mL de ACIN¹ + 25mL de água ultra-pura² + 1mL de MEM³ (aminoácidos não essenciais) + 3mL de BME⁴ (aminoácidos essenciais) + 37,6mg de glicina⁵ + 2,925mg de L-glutamina⁶ + 50mg mio-inositol⁷ + 10mg tri-citrato de sódio⁸ + 220mg NaHCO₃⁹. Mensurações de pH e osmolaridade da solução final foram de 7.4 e 290 mOsmol/L, respectivamente.

O fator de diluição adotado (75% de ACIN mais 25% de água ultra-pura, segundo Cordeiro et al., 2006) visou apenas a correção dos valores osmóticos. Em relação à concentração de mio-inositol, tri-citrato de sódio e aminoácidos foram adotados os mesmos valores estabelecidos na fórmula do meio SOF (HOLM et al., 1999).

¹ *Cocos nucifera* (aproximadamente 5 meses de idade)

² Sigma W-1503

³ Sigma M-7145

⁴ Sigma B-6766

⁵ Sigma G-6388

⁶ Sigma G-6392

⁷ Sigma I-7508

⁸ MERCK

⁹ MERCK

2.1.2 Obtenção dos Ovários

Os ovários foram obtidos no abatedouro da SOCIPE (Sociedade Cooperativa dos Pecuáristas), localizado no bairro do Tapanã em Belém, de vacas provenientes de diversos municípios do Estado do Pará, independente da idade, fase do ciclo estral, escore corporal ou estado nutricional dos animais.

Os ovários foram coletados logo após o abate, lavados e acondicionados em frasco com solução salina (0,9% cloreto de sódio¹⁰) à 30°C. Os mesmos foram transportados até o laboratório de Fecundação *In Vitro* do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará dentro de um período máximo de 3 horas.

2.1.3 Recuperação e Seleção dos Complexos *Cumulus*-Oócito (CCOs)

Folículos antrais de 2 a 8 mm foram puncionados utilizando-se agulhas¹¹ 40x12 e seringas¹² de 10mL, sendo o fluido folicular obtido depositado em tubos¹³ de 15mL. Terminada a aspiração, os tubos permaneceram em repouso durante 5 minutos para sedimentação. Após esse período o sobrenadante, constituído pelo líquido folicular, foi descartado e o pellet transferido para uma placa de Petri¹⁴

¹⁰ MERCK

¹¹ DB

¹² DB

¹³ TPP

¹⁴ TPP (60x15mm)

estéril de poliestireno. A manipulação dos CCOs foi realizada com tubo capilar de vidro¹⁵, com auxílio de estereomicroscópio¹⁶ e sob fluxo laminar¹⁷.

Os CCOs foram selecionados em Meio 199¹⁸ (tampão Hepes) acrescido 10% de SFB¹⁹ (v/v), 22µg/mL de piruvato²⁰ e 50µg/mL de gentamicina²¹. Foram selecionados os CCOs que apresentaram células do *cumulus oophorus* compactas e refringentes, citoplasma homogêneo e sem vacúolos ou grânulos escurecidos (LEIBFRIED & FIRST, 1979).

2.1.4 Maturação *In Vitro*

Os CCOs selecionados foram lavados e incubados, de acordo com o grupo experimental, em meio de **Meio 199**²² (tampão bicarbonato de sódio) ou **SAC-75S**. Os meios utilizados nesta etapa foram suplementados com 10% SFB (v/v), 0,5µg/mL FSH²³, 50µg/mL LH²⁴, 22µg/mL de piruvato e 50µg/mL de gentamicina segundo Lonergan et al. (1994b).

¹⁵ Classcyto-capilar sem heparina (75X1,2mm)

¹⁶ Olympus SZ-PT Japan

¹⁷ Veco

¹⁸ Gibco 12340-030

¹⁹ Gibco 12657-029

²⁰ Sigma P-5280

²¹ Sigma G-1264

²² Gibco 11150-059

²³ Folltropin-V BIONICHE

²⁴ Lutropin-V BIONICHE

2.1.5 Fecundação *In Vitro*

A incubação dos CCOs foi realizada em placas de petri de poliestireno²⁵, com gotas de 100 µL de meio de MIV (10 a 13 CCOs por gota) sob óleo mineral²⁶ estéril, em estufa²⁷ de cultivo com 5% de CO₂, 20% de O₂ e 75% de N₂ sob atmosfera úmida e temperatura de 38,5 °C.

Para a FIV foi utilizado sêmen congelado de um único touro (*Bos taurus taurus*) e mesma partida. O método de separação dos espermatozóides (SPTZ) dos crioprotetores e plasma seminal foi o gradiente de densidade descontínuo de Percoll²⁸. A mini-palheta (0,25 mL) de sêmen foi descongelada em água a 38,5 °C durante 30 segundos. Em seguida, o sêmen foi depositado sobre a coluna de 2 mL de gradientes de Percoll (45 e 90%) e centrifugado²⁹ (200g) por 7 minutos.

Após 18 horas de MIV, CCOs (20 a 25 por gota) e SPTZ foram co-incubados, sob as mesmas condições citadas para a MIV, em gotas (80 µL) com meio de fecundação (Fluido Sintético de Oviduto (SOF) segundo Holm et al., 1999, porém sem SFB e glicose). Nesta etapa o meio SOF foi acrescido de 10µg/mL de heparina³⁰, 2µM de penicilamina³¹, 1µM de hipotaurina³², 0,25µM de epinefrina³³, 6mg/mL BSA³⁴, 22µg/mL de piruvato e 50µg/mL de gentamicina.

²⁵ Corning (35X10mm)

²⁶ Sigma M-8410

²⁷ Forma Scientific Modelo 3110

²⁸ Sigma P-4937

²⁹ Fanem 206-R

³⁰ Sigma H-3149

³¹ Sigma P-4875

³² Sigma H-1364

³³ Sigma E-4250

³⁴ Sigma A-6003 (Fração V)

2.1.6 Cultivo *In Vitro* dos Embriões

Após 32 horas do início da FIV, os prováveis zigotos foram submetidos a sucessivas pipetagens para retirada das células do *cumulus oophorus* restantes e dos SPTZ aderidos à zona pelúcida, e então transferidos, de acordo com o Grupo Experimental, para gotas com meio **SOF** (1 mM de glicose³⁵) ou **SAC-75S**. Os meios utilizados na etapa de cultivo embrionário foram suplementados com 10% de SFB, 6mg/mL de BSA, 80µg/mL piruvato e 50µg/mL gentamicina.

Para dar suporte ao desenvolvimento embrionário foi realizado um sistema de co-cultivo dos embriões com monocamada de células do *cumulus oophorus* que aderiram à placa durante a MIV. Para isso, logo após a FIV, a placa pós MIV teve seu meio substituído por 100µL de meio de cultivo embrionário e permaneceu incubada aguardando o momento da transferência dos embriões.

2.1.7 Delineamento Experimental

Foram realizadas 3 repetições, com 20 CCOs por grupo. O Grupo Controle foi representado pela maturação em Meio 199 e cultivo embrionário em meio SOF; o Grupo M-Coco pela maturação em SAC-75S e cultivo em SOF; o Grupo C-Coco pela maturação em Meio 199 e cultivo em SAC-75S e o Grupo MC-Coco pela maturação e cultivo embrionário em SAC-75S (Tabela 1).

³⁵ MERCK

Tabela 1: Delineamento Experimental

Grupos experimentais	Maturação Oocitária		Cultivo Embrionário	
	Meio 199	SAC-75S	SOF	SAC-75S
Controle	X		X	
M-Coco		X	X	
C-Coco	X			X
MC-Coco		X		X

M-Coco= Maturação oocitária em SAC-75S; C-Coco= Cultivo embrionário em SAC-75S; MC-Coco= Maturação oocitária e Cultivo embrionário em SAC-75S.

2.1.8 Avaliação Quantitativa do Desenvolvimento Embrionário *In Vitro*

O desenvolvimento embrionário foi avaliado, com auxílio de estereomicroscópio, de acordo com taxa de clivagem e formação de blastocisto no segundo e sétimo dias de cultivo *in vitro*, respectivamente (Figura 1), de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões* - IETS (STRINGFELLOW & SEIDEL 1999).

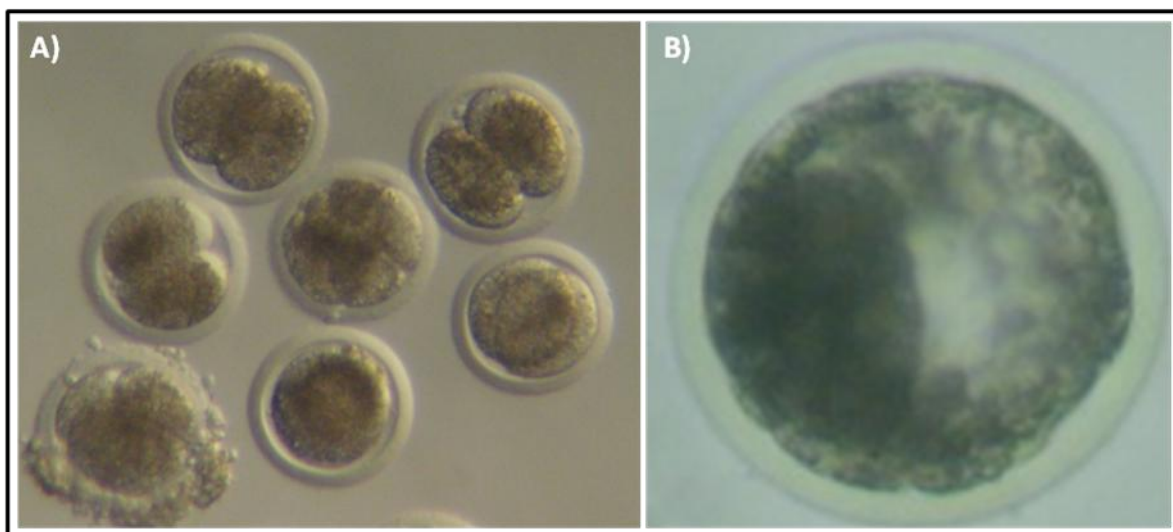


Figura 1: Fotomicrografia de embriões bovinos: A- embriões com duas ou mais células no segundo dia de cultivo (150X); B- embrião em estágio de blastocisto no sétimo dia de cultivo *in vitro* (600X).

2.1.9 Análise Estatística

As taxas de clivagem e blastocisto obtidas foram transformadas para Arcoseno e submetidos à análise da variância (ANOVA – pós teste Bonferroni, nível de significância 5%), com auxílio do programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora a SAC-75S tenha possibilitado a sobrevivência e maturação dos CCOs, uma vez que as taxas de clivagens dos Grupos M-Coco ($83,33 \pm 2,88\%$) e MC-Coco ($75 \pm 5\%$) foram semelhantes ($p > 0,05$) ao Grupo Controle ($86,66 \pm 2,88\%$), corroborando com os resultados obtidos por Blume et al. (1997a), a mesma não foi capaz de garantir processos de maturação oocitária e desenvolvimento embrionário “adequados”, reduzindo significativamente ($p < 0,05$) a taxa de formação de blastocisto no Grupo M-Coco ($21,66 \pm 8,33\%$) e inviabilizando o desenvolvimento embrionário nos Grupos C-Coco (0%) e MC-Coco (0%) (Tabela 2).

Tabela 2: Taxas de clivagem e formação de blastocisto após maturação oocitária e/ou cultivo embrionário em solução a base de água de coco a 75% suplementada com mio-inositol, tri-citrato de sódio e aminoácidos.

Grupos	n	% Clivagem	% Blastocisto
experimentais	CCOs		
Controle	60	$86,66 \pm 2,88$	$46,66 \pm 8,33^a$
M-Coco	60	$83,33 \pm 2,88$	$21,66 \pm 8,33^b$
C-Coco	60	$78,33 \pm 2,88$	0^c
MC-Coco	60	$75,00 \pm 5,00$	0^c

n= Número amostral; M-Coco= Maturação oocitária em SAC-75S; C-Coco= Cultivo embrionário em SAC-75S; MC-Coco= Maturação oocitária e Cultivo embrionário em SAC-75S. n CCOs= Número de complexos *cumulus*-oócitos; ^{a,b,c} Sobrescritos diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Os resultados de clivagem corroboram com os trabalhos que revelam a grande plasticidade e tolerância dos CCOs quando submetidos a condições de estresse subletais (JU et al., 1999; VANDAELE et al., 2010), o que justifica os resultados obtidos por Cordeiro et al. (2006) onde os CCOs, após manutenção em solução base de água de coco por um período de até 6h, foram capazes de maturar, sofrer fecundação e desenvolver até o estágio de blastocisto.

Entretanto, quando foi avaliada a capacidade de desenvolvimento até o estágio de blastocisto, após maturação oocitária e/ou cultivo embrionário em SAC-75S, processos estes que exigem um tempo maior de exposição, 18 e 168h, respectivamente, a condição tornou-se bastante adversa influenciando negativamente às taxas de formação de blastocisto dos CCOs maturados em SAC-75S e inviabilizando o desenvolvimento embrionário, e até mesmo a sobrevivência da monocamada de células do *cumulus oophorus*, quando empregada como meio de CIV.

Nossos resultados corroboram com o trabalho de Nascimento et al. (2007) que observaram efeito deletério da água de coco em pó (ACP[®]312) no cultivo *in vitro* de embriões suínos e discordam dos obtidos por Blume et al. (1997b) que relataram sucesso no cultivo de embriões bovinos em solução a base de água de coco, entretanto devemos levar em consideração as diferenças em relação à composição do meio como, origem e idade dos frutos, fator de diluição e suplementação utilizados.

4 CONCLUSÕES

A utilização da solução a base de água de coco a 75% suplementada com mio-inositol, tri-citrato de sódio e aminoácidos (SAC-75S), durante o processo de maturação oocitária, não interferiu na taxa de clivagem, entretanto, reduziu a taxa de formação de blastocisto em bovinos.

Quando a SAC-75S foi empregada no cultivo de embriões bovinos a mesma inviabilizou o desenvolvimento embrionário.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO QUÍMICA DA ÁGUA DE COCO *IN NATURA* EM COMPARAÇÃO COM O MEIO 199

RESUMO

Em função dos resultados negativos obtidos no experimento do Capítulo 2, o objetivo deste capítulo foi avaliar algumas características químicas da água de coco *in natura* em diferentes estádios de maturação (3, 4 e 5 meses) do fruto, em comparação com o Meio 199. Sendo avaliado, também, o efeito do processo de filtração (0,22 μ m) nos valores obtidos. A análise química foi realizada no Laboratório de Bebidas e Vinagres de acordo com protocolo interno. A análise estatística foi realizada através da ANOVA (pós-teste Tukey, com nível de significância de 5%). Os valores de pH aos 3 meses ($4,88 \pm 0,06$) foi significativamente diferente ($p < 0,05$) dos valores encontrados aos 4 ($4,79 \pm 0,04$) e 5 meses ($4,75 \pm 0,05$), assim como o do Meio 199 (7,4). Com relação à osmolaridade (mOsmol/L), houve diferença ($p < 0,05$) entre os Grupos de 3 ($273 \pm 8,2$) e 5 meses ($335 \pm 24,6$) em relação ao 4 meses ($290 \pm 8,6$) e o Meio 199 (290). A concentração de proteína ($0,2557 \pm 0,0138$; $0,4699 \pm 0,05$; $0,7966 \pm 0,0045$ e $0,853$ mg/mL) e glicose ($11,7 \pm 0,8$; $15,8 \pm 0,5$; $19,9 \pm 0,3$ e $4,3$ g/100mL) dos Grupos 3, 4 e 5 meses e Meio 199, respectivamente, foram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$). A análise do sódio (mg/100mL) revelou diferença ($p < 0,05$) do Grupo 3 meses ($34,09 \pm 4,36$) quando comprado aos Grupos 4 meses ($30,11 \pm 0,193$), 5 meses ($30,16 \pm 0,1752$) e Meio 199 (28,64). A concentração de potássio (mg/100mL) dos Grupos 3 ($177,81 \pm 12,23$) e 5 meses ($156,37 \pm 25,0284$) foi significativamente diferente ($p < 0,05$) do Grupo 4 meses ($132,33 \pm 2,32$), sendo todos diferentes em relação ao Meio 199 (34,66). Já as concentração de cálcio e magnésio (mg/100mL) mostraram-se diferentes ($p < 0,05$) entre todos os Grupos

experimentais (3 meses: $17,07 \pm 2,76$ e $1,57 \pm 0,20$; 4 meses: $12,1 \pm 1,73$ e $1,04 \pm 0,12$; 5 meses: $7,72 \pm 0,32$ e $8,364 \pm 0,20$ e Meio 199: 3,55 e 2,15, respectivamente). Com relação ao ferro (mg/100mL) a água-de-coco aos 5 meses ($0,0036 \pm 0,0007$; $p < 0,05$) apresentou quantidade superior aos Grupos 3 ($0,0013 \pm 0,0001$) e 4 meses ($0,0014 \pm 0,0002$). Não foi detectado ferro na amostra de Meio 199. A avaliação do cloreto (mg/mL), não revelou diferença estatística ($p > 0,05$) entre os Grupos experimentais analisados. O processo de filtragem influenciou nos resultados de glicose, proteína, sódio, potássio e magnésio. Portanto, a água de coco *in natura* apresentou consideráveis variações nas concentrações dos constituintes analisados em relação a idade de maturação do fruto e, principalmente, quando comparada ao Meio 199.

ABSTRACT

Due to the negative results obtained in the experiment of Chapter 2, the purpose of this chapter was to evaluate some chemical characteristics of fresh coconut water at different stages of maturation (3, 4 and 5 months) of the fruit, compared to Medium 199. It was also evaluated the effect of the filtration process (0.22 μm) in the values obtained. Chemical analysis was carried out in Laboratory of Beverages and Vinegars in according to internal protocol. Statistical analysis was performed using ANOVA (Tukey post-test, with significance level of 5%). The pH values at 3 months (4.88 ± 0.06) was significantly different ($p < 0.05$) from the values found for 4 (4.79 ± 0.04) and 5 months (4.75 ± 0.05), as well as the Medium 199 (7.4). With respect to osmolarity (mOsmol/L), there was difference ($p < 0.05$) between the groups of 3 months (273 ± 8.2) and 5 months (335 ± 24.6) compared to 4 months (290 ± 8.6) and Medium 199 (290). The protein values (0.2557 ± 0.0138 , 0.4699 ± 0.05 , 0.7966 ± 0.0045 e 0.853 mg/mL) and glucose (11.7 ± 0.8 , 15.8 ± 0.5 , 19.9 ± 0.3 and 4.3 g/100 mL) in Groups 3, 4 and 5 months and Medium 199, respectively, were statistically different ($p < 0.05$). The analysis of sodium (mg/100 mL) revealed differences ($p < 0.05$) from the Group 3 months (34.09 ± 4.36) when compared with the group of 4 months (30.11 ± 0.193), 5 months (30.16 ± 0.1752) and Medium 199 (28.64). The concentration of potassium (mg/100mL) of the Groups of 3 (177.81 ± 12.23) and 5 months (156.37 ± 25.0284) were significantly different ($p < 0.05$) from Group 4 months (132.33 ± 2.32), being the results of all the previous groups different from the Medium 199 (34.66). In relation to calcium and magnesium the concentration (mg/100mL) were different ($p < 0.05$) among all

experimental groups (3 months: 17.07 ± 2.76 and 1.57 ± 0.20 , 4 months: 12.1 ± 1.73 and 1.04 ± 0.12 ; 5 months: 7.72 ± 0.32 and $8,364 \pm 0.20$ and medium 199: 3.55 and 2.15, respectively). With respect to iron (mg/100mL) the coconut water at 5 months (0.0036 ± 0.0007 , $p < 0.05$) showed much higher concentration than the three groups (0.0013 ± 0.0001) and 4 months (0.0014 ± 0.0002). No iron was detected in the sample of 199 Media. Assessment of chloride (mg/mL) showed no statistical difference ($p > 0.05$) between the experimental groups analyzed. The process of filtration influenced the results of glucose, protein, sodium, potassium and magnesium. Therefore, the coconut water *in natura* showed considerable variations in the concentrations of constituents analyzed in relation to age of fruit ripening, and especially when compared to Medium 199.

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que a composição do meio de cultivo exerce forte influencia sobre o desenvolvimento embrionário (HOLM et al., 2002; NEDAMBALE et al., 2004; MARTÍN-ROMERO et al., 2008; PURPERA et al., 2009; SAADELDIN et al., 2011), e embora o potencial de desenvolvimento dependa, também, da habilidade do embrião em manter a homeostase celular, é importante que as condições de cultivo sejam estabelecidas de forma a minimizar o estresse oriundo da condição *in vitro* (LANE, 2001).

Nesse contexto, e em função dos resultados negativos obtidos no Capítulo 2, foi necessário uma melhor avaliação de algumas propriedades químicas da ACIN, uma vez que a presença e, principalmente, a concentração de algumas substâncias como aminoácidos (TAKAHASHI & FIRST, 1992; KIM et al., 1993b; ROSENKRANS & FIRST, 1994; EDWARDS et al., 1998; STEEVES & GARDNER, 1999), carboidratos (TAKAHASHI & FIRST, 1992; PINYOPUMMINTR & BAVISTER, 1996b; KHURANA & NIEMANN, 2000; KWUN et al., 2003; RUBESSA et al., 2011) e íons (LIU & FOOTE, 1996; THOMPSON, 1996a), são fundamentais para manutenção do metabolismo celular e desenvolvimento embrionário adequados.

Sendo assim a proposta deste Capítulo foi avaliar as concentrações de proteínas, glicose e sais minerais da ACIN em comparação ao Meio 199, desenvolvido para cultura de tecidos e rotineiramente utilizado na PIVE. Foram avaliadas, também, a influência da idade de maturação do fruto (3, 4 e 5 meses) e o processo de filtragem (membrana de 0,22 μ m) na constituição química da ACIN.

1.1 HIPÓTESE

A água de coco *in natura* apresenta composição química inadequada ao cultivo de oócitos e embriões.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar algumas propriedades químicas da água de coco (*Cocos nucifera*) *in natura* em comparação com o Meio 199.

1.2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o pH, osmolaridade, proteínas, glicose e minerais [Na, Cl, Mg, Fe, Ca, K] da água de coco *in natura* de frutos com 3, 4 e 5 meses de idade;

Avaliar a influência do processo de filtração na composição da água de coco *in natura*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DOS FRUTOS E MENSURAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DA ÁGUA DE COCO *IN NATURA*

Os frutos foram coletados de 10 cultivares de coqueiro anão verde localizados na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA - avenida perimetral s/n, no município de Belém-PA) e levados ao Laboratório de Bebidas e Vinagres (LABEV) pertencente ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO-PARÁ), num período máximo de vinte minutos. Os coqueiros selecionados encontravam-se próximos um ao outro com a finalidade de terem sofrido as mesmas alterações no que diz respeito ao clima, tipo de solo, propagação de vento e temperatura.

A idade foi determinada pela senescência do fruto. Segundo FRÉMOND et al. (1969) o coqueiro produz um cacho por mês e como os cachos crescem em espiral, em função da filotaxia das folhas, o estágio 1 consistiu do cacho mais recente e os demais estágios foram determinados pela posição descendente em que se apresentaram em relação ao estágio 1 (Figura 2).

Os valores de pH a 20°C e osmolaridade (mOsmol/L) foram determinados com auxílio do pHmetro da marca mPA-210 e o equipamento Vapro®Osmometer, respectivamente.



Figura 2: *Cocos nucifera* com frutos em vários estádios do desenvolvimento. Cachos com aproximadamente 1 (seta branca) e 2 meses (seta vermelha).

A concentração de Glicose (g/100mL) foi determinada através da titulação, pelo método Eynon Lane. Teve como princípio a reação dos açúcares redutores juntamente com os íons cúpricos da solução de Fehling, que sob a ação do calor e em meio alcalino, com auxílio de um fogareiro e pseta de calibração, reduz-se a íons cuprosos. Ao reagir com os íons cúpricos, os açúcares sofrem oxidação, enquanto que o cobre é reduzido, formando-se um precipitado vermelho de óxido cuproso.

As Proteínas (mg/mL) foram determinadas utilizando um digestor e destilador/macro (modelo 2200 kjeltec auto distillation da marca FOOST TECATOR). A análise tem como princípio a determinação do nitrogênio, feita pelo processo de digestão Kjeldahl, onde a matéria orgânica é decomposta e o nitrogênio existente é transformado em amônia, com isso introduz-se o fator de correção 5,75 para transformar o número de g de nitrogênio encontrado em número de g de protídios (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

Os valores de íons Cálcio (mg/10mL), Magnésio e Ferro (mg/100mL) foram determinados a partir das cinzas. Para avaliação quantitativa foi empregado a espectrofotometria de absorção atômica (AA) em chama, realizada no equipamento da marca VARIAN 220 FS, utilizando-se as condições padrão do fabricante VARIAN para cada elemento. Este método baseia-se na quantificação por meio da medida da absorvidade de determinado comprimento de onda, específicos aos átomos de cada elemento, regenerados em condições de alta temperatura, obtida em uma chama de ar/acetileno.

Para avaliação de Potássio e Sódio (mg/100mL) as amostras foram diluídas na proporção de 1/100 e injetadas no equipamento de fotometria em chama. Esta análise baseia-se na quantificação por meio da medida de emissão de luz produzida por estes elementos quando submetidos a condições de alta temperatura (chama ar-butano).

Os valores de Cloreto (mg/mL) foram determinados a partir do método de Mohr, segundo o INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985) através da titulação com nitrato de prata. Para isso, foram transferidos 5 mL de amostra para um frasco de erlenmeyer de 125 mL, adicionando-se em seguida 3 gotas de cromato de potássio (K_2CrO_4 à 5%) agitando-o, e titulou-se com solução de nitrato de prata

(AgNO₃ à 0,05N). O ponto final é assinalado pelo aparecimento permanente de cromato de prata, caracterizado pela formação de um precipitado de coloração avermelhada, observando-se o volume gasto.

2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram analisados um total de 144 frutos distribuídos em 6 repetições, sendo que cada avaliação contou com 24 frutos (8 com 3, 8 com 4 e 8 com 5 meses de idade de maturação do fruto) e cada grupo foi dividido em dois subgrupos: FILTRADO³⁶ E NÃO FILTRADO. A subdivisão se fez necessária pelo fato dos meios empregados no cultivo celular serem submetidos ao processo de filtração, para remoção de possíveis agentes contaminantes. Sendo assim foi importante avaliar, também, se esse processo pode influenciar na concentração dos componentes químicos da água de coco.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das mensurações foram submetidos à análise da variância (ANOVA - pós teste Tukey, nível de significância 5%), com auxílio do programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

³⁶TPP (membrana filtrante com poro de 0,22 µm)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pH da ACIN aos 3 meses não filtrada e filtrada ($4,88 \pm 0,06$ e $4,92 \pm 0,05$, respectivamente) foi significativamente diferente ($p < 0,05$) dos valores encontrados aos 4 ($4,79 \pm 0,04$ e $4,77 \pm 0,06$) e 5 meses ($4,75 \pm 0,05$ e $4,73 \pm 0,03$), assim como o do Meio 199 (7,4) (Figura 3). Estes resultados estão de acordo com a literatura, pois segundo TAVARES et al. (1998) o pH da água de coco, aos 5 meses de idade, encontra-se em torno de 4.7 a 4.8. No entanto, em função dos cultivos celulares requererem um pH em torno da neutralidade (7.2 - 7.4) é comum e indicado o ajuste das soluções a base de água de coco com tampões como citrato de sódio (NUNES, 1997), hidróxido de sódio (APRÍGIO, 2003) e HEPES (CORDEIRO et al., 2006).

Todos os Grupos apresentaram concentrações de glicose (g/100mL) significativamente ($p < 0,05$) mais elevado em função da idade e, principalmente, em comparação com o Meio 199, com exceção dos subgrupos não filtrado e filtrado ($2,9 \pm 0,08$ e $2,7 \pm 0,064$, respectivamente) de 4 meses em relação ao subgrupo filtrado com 5 meses ($2,9 \pm 0,09$), indicando que nesse estágio o processo de filtração pode influenciar no resultado (Figura 4). Os valores de glicose aos 5 meses obtidos neste trabalho foram similares aos obtidos por TAVARES et al. (1998), assim como o aumento da concentração da glicose em função da idade do coco, o que segundo os autores só começa a decrescer a partir do 9º mês.

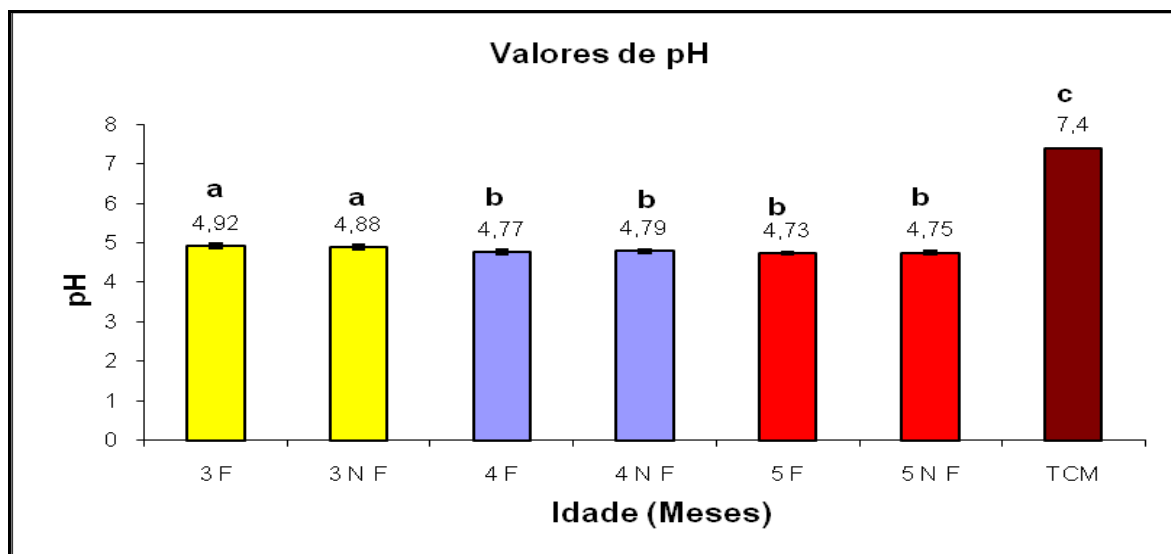


Figura 3: Valores de pH aos 3, 4 e 5 meses de maturação do fruto; ^{a,b,c} Sobrescritos diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$); F= Filtrado; NF= Não filtrado.

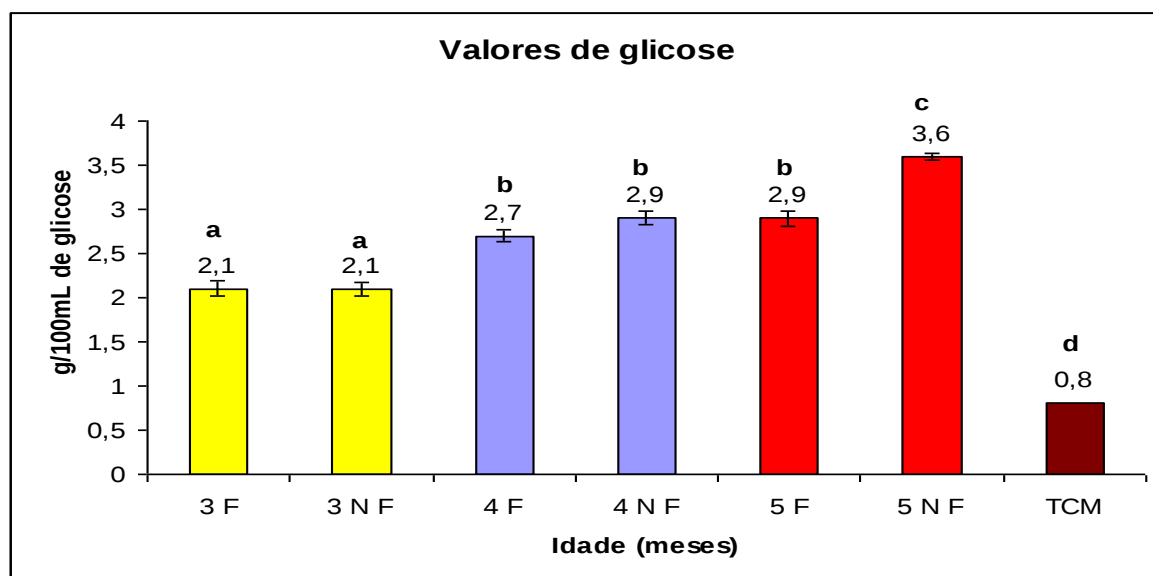


Figura 4: Concentração de glicose aos 3, 4 e 5 meses de maturação do fruto; ^{a,b,c,d} Sobrescritos diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$); F= Filtrado; NF= Não filtrado.

Nos sistemas de PIVE é comum a suplementação dos meios de cultivo com carboidratos como glicose e frutose, com diferentes respostas dependentes principalmente, das concentrações e estágio de desenvolvimento embrionário (KIM et al., 1993b; THOMPSON et al., 1996b; BARCELÓ-FIMBRES & SEIDEL, 2007; BHUIYAN et al., 2007). Entretanto, elevados valores de glicose apresentam efeito deletério para o desenvolvimento, diminuindo o número de células embrionárias (DONNAY et al., 2002), aumentando a frequência de células apoptóticas (LIMÉNEZ et al., 2005) e reduzindo significativamente a taxa de formação de blastocisto (KIM et al., 1993a; MATSUYAMA et al., 1993; IWATA et al., 1998; DONNAY et al., 2002; KIMURA et al., 2005), tornando-se uma forte limitação para meios de cultivo a base de água de coco.

A quantidade de proteína encontrada na água de coco aos 3, 4 e 5 meses foi significativamente ($p < 0,05$) diferente em comparação ao Meio 199 (Figura 5). Houve diferença ($p < 0,05$), também, entre os subgrupos filtrado e não filtrado aos 4 ($0,470 \pm 0,051$ *versus* $0,363 \pm 0,001$, respectivamente) e 5 meses ($0,797 \pm 0,005$ *versus* $0,596 \pm 0,001$, respectivamente). Embora haja um aumento na quantidade de proteína acompanhando o estado de maturação do fruto (SREBERNICH, 1998; JACKSON et al., 2004), os valores detectados até aos 5 meses foram inferiores ao Meio 199, corroborando com a necessidade de suplementação das soluções a base de água de coco com aminoácidos dada a importância dos mesmos nas taxas de formação de blastocisto (LEE et al., 2004) e qualidade embrionária (LI et al., 2006).

Os valores de potássio foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), entre o Meio 199 (34,66 mg/100mL) e os demais Grupos experimentais, bem como entre o Grupo de 3 meses ($177,81 \pm 12,23$ e $184,89 \pm 10,55$ mg/100mL não filtrado e

filtrado, respectivamente) e os Grupos de 4 meses ($132,33 \pm 2,32$ e $130,33 \pm 18,40$ mg/100mL não filtrado e filtrado, respectivamente) e 5 meses subgrupo filtrado ($137,55 \pm 32,34$ mg/100mL) (Figura 6).

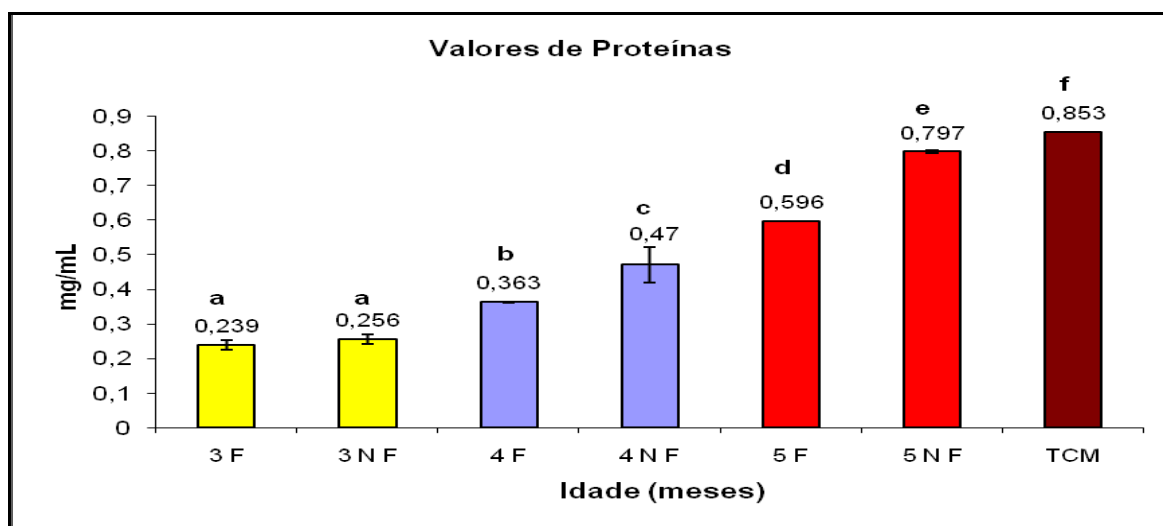


Figura 5: Concentração de proteína aos 3, 4 e 5 meses de maturação do fruto; a,b,c,d,e,f Sobrescritos diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$); F= Filtrado; NF= Não filtrado.

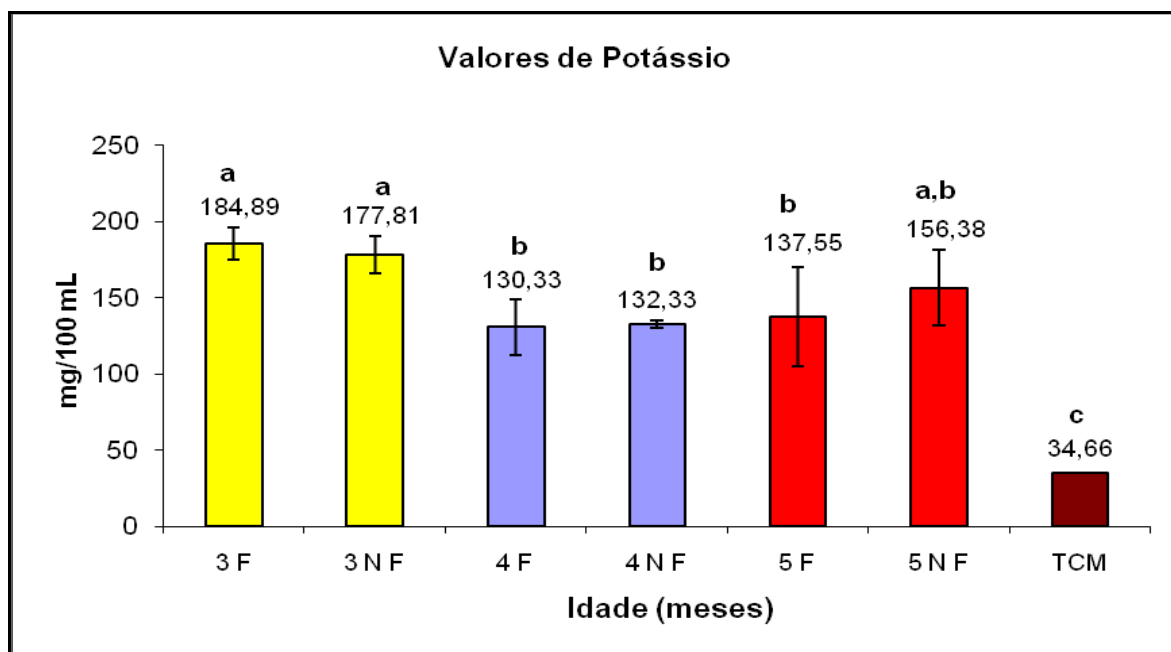


Figura 6: Concentração de potássio aos 3, 4 e 5 meses de maturação do fruto; a,b,c Sobrescritos diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$); F= Filtrado; NF= Não filtrado.

Em relação à concentração do cálcio e magnésio houve diferença ($p < 0,05$) entre todos os Grupos experimentais com sensível redução do cálcio (Figura 7) e aumento do magnésio (Figura 8) em função do aumento da idade do fruto, o que esta de acordo com o descrito por PUE et al. (1992). No entanto, mesmo com esta redução as concentrações de cálcio da água-de-coco continuam muito acima dos valores obtidos para o Meio 199. Apenas o magnésio apresentou variação significativa ($p < 0,05$) entre os subgrupos não filtrado e filtrado aos 5 meses ($8,364 \pm 0,20$ versus $6,493 \pm 0,44$ mg/100mL, respectivamente).

Em relação a concentração de sódio foi observado diferença apenas do Grupo 3 meses entre não filtrada e filtrada ($34,10 \pm 0,06$ versus $22,01 \pm 0,41$ mg/100mL, respectivamente; $p < 0,05$) e destes em relação aos demais Grupos experimentais (Figura 9). A avaliação de cloreto não mostrou variação significativa ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais analisados (Figura 10), o que está de acordo com Aragão et al., (2001) que cita que os valores de cloretos mantêm-se estáveis durante todo processo de maturação.

Com relação ao ferro, a água-de-coco aos 5 meses apresentou quantidade superior ($p < 0,05$) em relação aos Grupos 3 e 4 meses e o Meio 199, sendo este último caracterizado pela ausência de ferro (Figura 11). A presença de ferro pode representar um ponto positivo para a água de coco, uma vez que Gao et al. (2007) demonstraram que a adição de ferro (1,96mg/L) ao meio de MIV e CIV proporcionou aumento na taxa de desenvolvimento embrionário e reduziu o número de blastômeros apoptóticos.

Os valores de osmolaridade (mOsmol/L) não foram diferentes ($p > 0,05$) entre os subgrupos filtrados e não filtrados dentro de cada idade do fruto, assim como entre os Grupos 3 meses não filtrada ($273 \pm 8,2$), 4 meses filtrada ($290 \pm 8,6$)

e o Meio 199 (290). Entretanto a água de coco aos 5 meses não filtrada ($335 \pm 24,6$) e filtrada ($338 \pm 9,1$) apresentaram osmolaridade superior ($p < 0,05$) a de todos os demais Grupos experimentais como descrito na Figura 12.

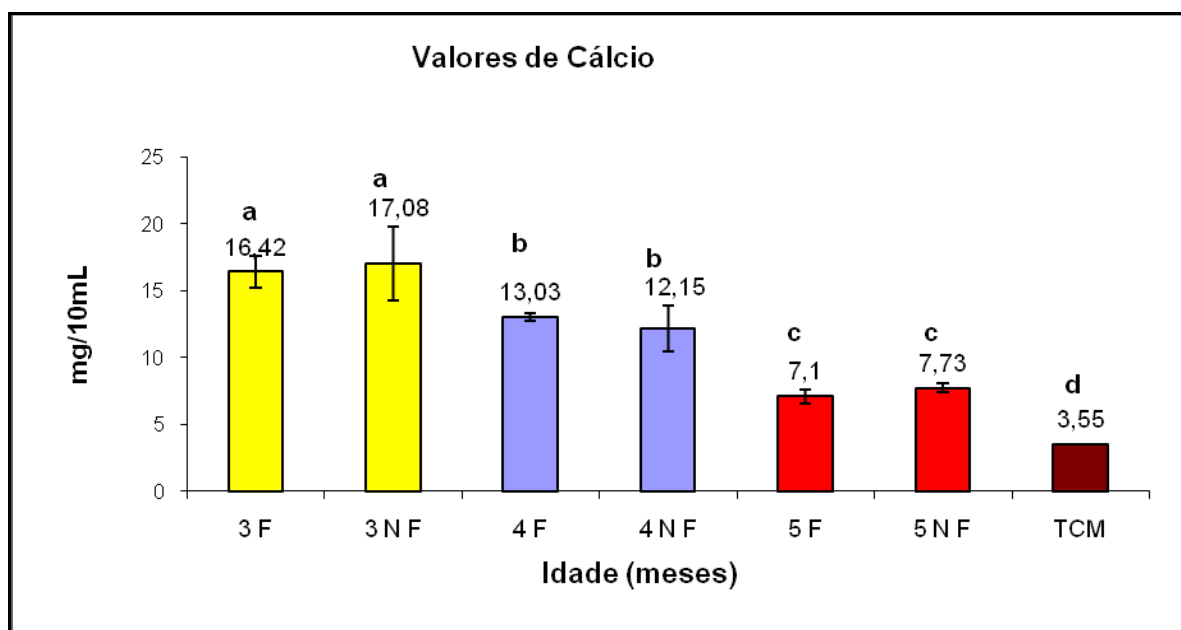


Figura 7: Concentração de cálcio aos 3, 4 e 5 meses de maturação do fruto; ^{a,b,c,d} Sobrescritos diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$); F= Filtrado; NF=

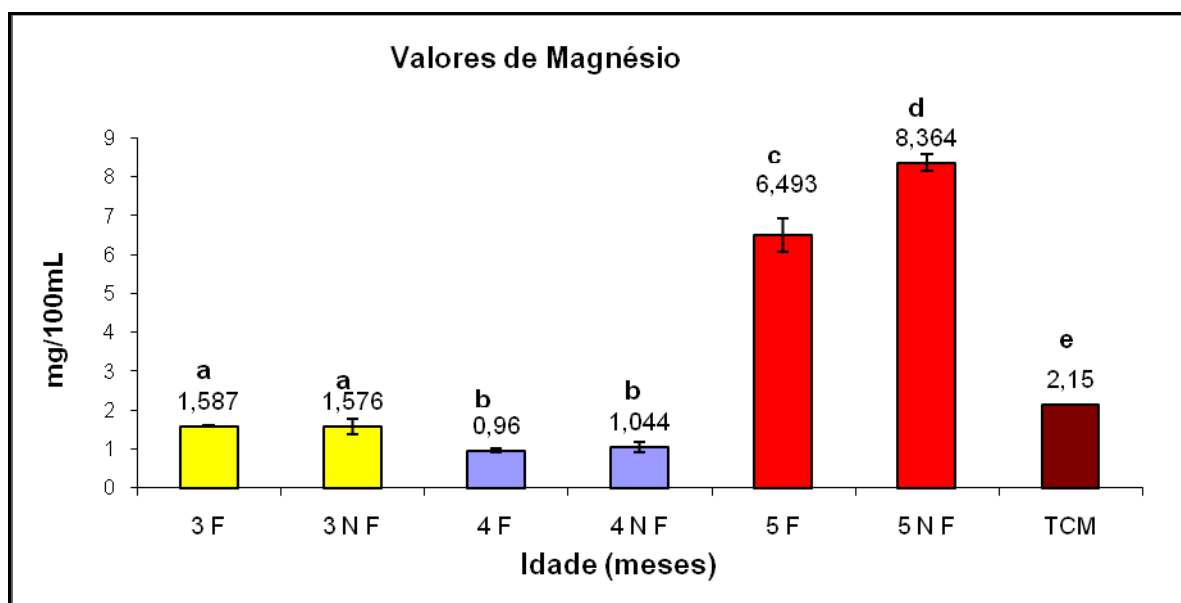


Figura 8: Concentração de magnésio aos 3, 4 e 5 meses de maturação do fruto; ^{a,b,c,d,e} Sobrescritos diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$); F= Filtrado; NF= Não filtrado.

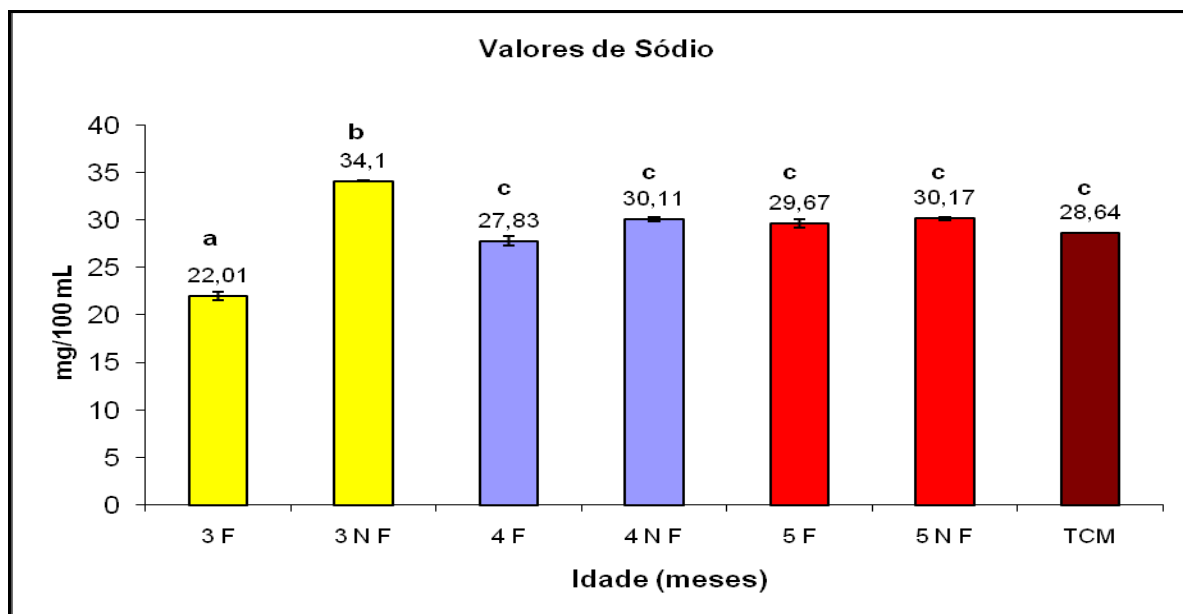


Figura 9: Concentração de sódio aos 3, 4 e 5 meses de maturação do fruto; a,b,c Sobrescritos diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$); F= Filtrado; NF= Não filtrado.

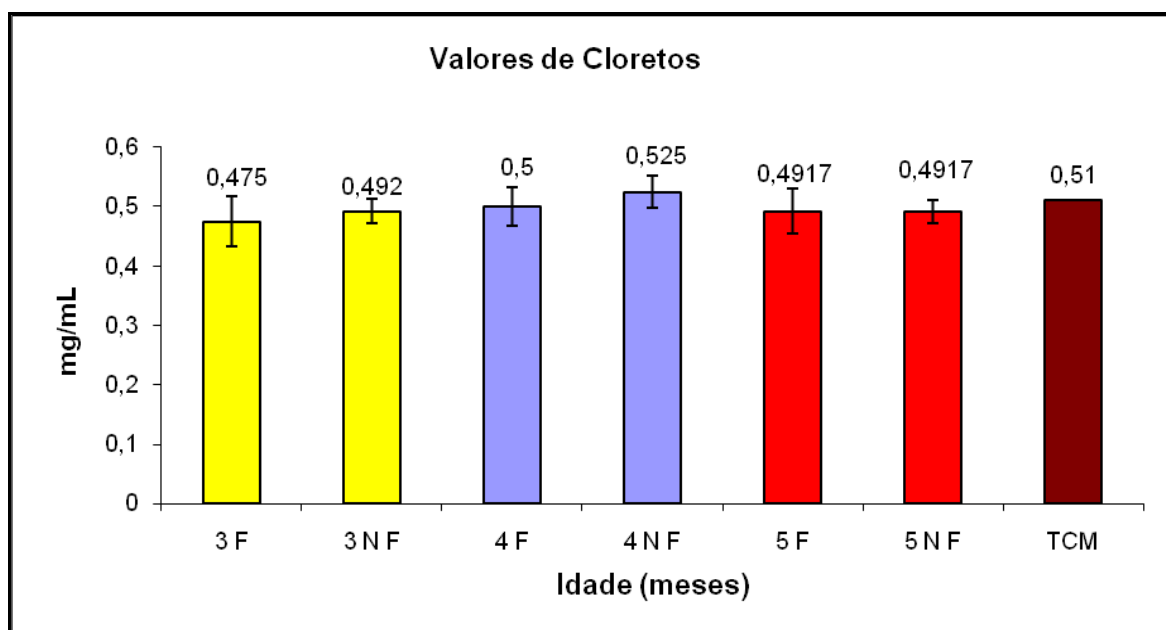


Gráfico 10: Concentração de cloreto aos 3, 4 e 5 meses de maturação do fruto; F= Filtrado; NF= Não filtrado.

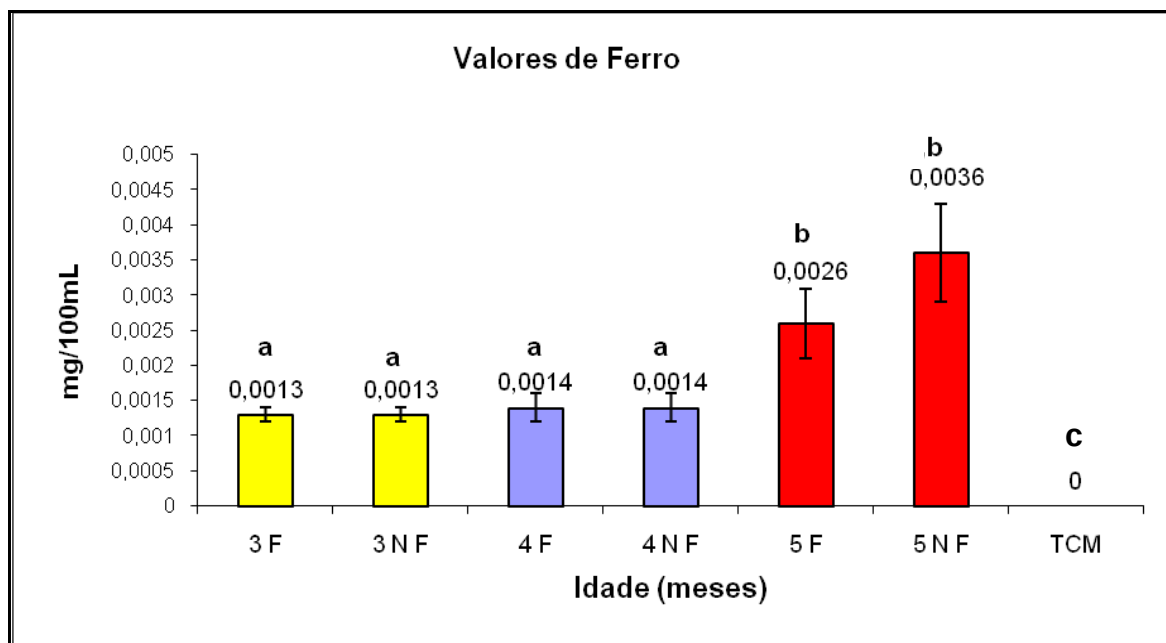


Figura 11: Concentração de ferro aos 3, 4 e 5 meses de maturação do fruto; ^{a,b,c} Sobrescritos diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$); F= Filtrado; NF= Não filtrado.

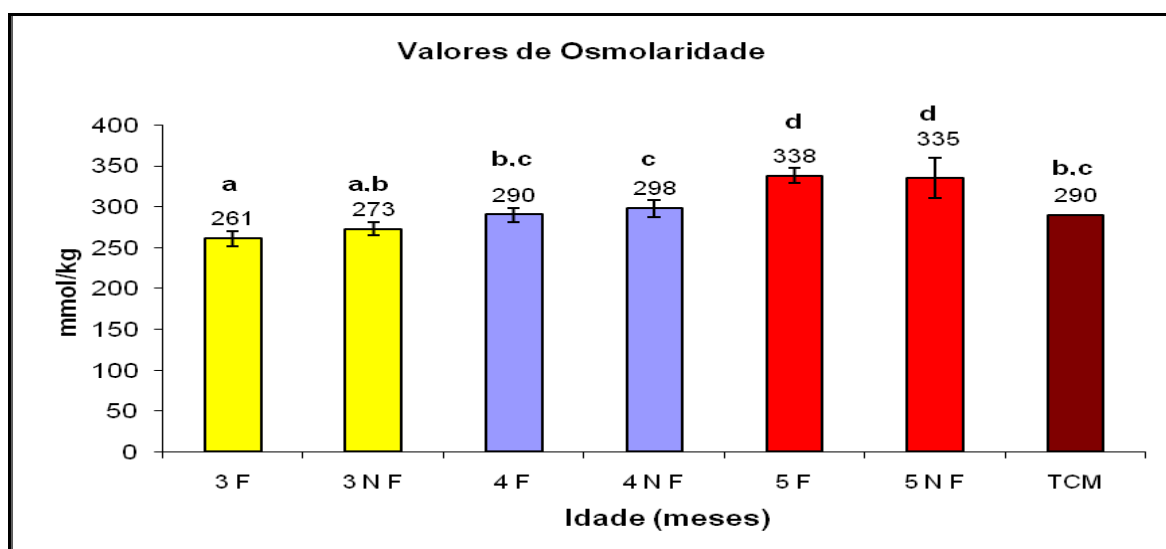


Figura 12: Valores de osmolaridade aos 3, 4 e 5 meses de maturação do fruto; ^{a,b,c,d} Sobrescritos diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$); F= Filtrado; NF= Não filtrado.

A grande diferença nas concentrações de alguns íons mensurados neste trabalho representa uma forte limitação na utilização das soluções a base de água de coco como meio de cultivo celular, por influenciar na habilidade celular em controlar os níveis homeostáticos afetando seu metabolismo (LANE et al., 2000), uma vez que já foi demonstrado que o aumento na concentração de íons inorgânicos no meio de cultivo provocou redução na taxa de desenvolvimento embrionário (LAWITTS & BIGGERS, 1992) e síntese de proteínas (ANBARI & CHULTZ, 1993) bem como desregulação da expressão gênica (HO et al., 1994).

Portanto, em função das análises realizadas percebe-se que a água de coco não apresenta propriedades químicas adequadas ao cultivo de oócitos e embriões, sendo sua utilização vinculada a necessidade de vários ajustes em sua constituição.

4 CONCLUSÕES

Todos os constituintes da água de coco analisados neste trabalho, com exceção do cloreto, apresentaram concentrações químicas bastante diferentes das encontradas para o Meio 199.

O estágio de desenvolvimento do fruto (3, 4 e 5 meses) influenciou nos valores de osmolaridade, pH, glicose, proteínas, magnésio, cálcio, potássio, sódio e ferro analisados.

O processo de filtração influenciou nos resultados de glicose, proteína, sódio e magnésio;

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DE UMA SOLUÇÃO DE ÁGUA DE COCO A 20% NO CULTIVO DE CÉLULAS DO *CUMULUS OOPHORUS* BOVINO

RESUMO

A proposta deste capítulo foi avaliar uma nova formulação para a solução de coco (SAC), caracterizada, principalmente, por um fator de diluição maior, em função dos resultados da análise química obtidos no Capítulo 3. No Experimento 1 foi avaliado o potencial de uma SAC constituída por 20% de água de coco *in natura*, suplementada apenas com 10% de SFB, piruvato e antibiótico (**SAC-20**), em promover o crescimento de células do *cumulus oophorus* oriundas de biópsias de complexos *cumulus*-oócito (CCOs) imaturos. O pH foi corrigido com NaHCO_3 e a osmolaridade com NaCl e MgSO_4 (280 mOsmol/L). O Grupo Controle foi representado pelo cultivo em Meio 199. No Experimento 2 foi avaliado o potencial da SAC-20, descrita no Experimento 1, porém, suplementada com mio-inositol, tri-citrato de sódio, aminoácidos e BSA (**SAC-20S**), em promover o crescimento de células do *cumulus oophorus* oriundas de CCOs após 18h de MIV. Nesta etapa o Grupo Controle foi representado pelo cultivo em meio SOF. No Experimento 1 a SAC-20 foi capaz de promover adesão e crescimento celular até o terceiro dia de cultivo, sendo observado morte celular a partir do 4 dia. No Experimento 2 a SAC-20S foi capaz de promover o crescimento de células do *cumulus oophorus*, por um período de 7 dias, com características semelhantes ao Grupo Controle. Portanto, a nova formulação para a SAC, estabelecida no Experimento 2, foi capaz de promover o crescimento da células do *cumulus oophorus* dentro dos padrões esperados para os sistemas co-cultivo na PIVE.

ABSTRACT

The purpose of this chapter was to evaluate a new formulation for the solution of coconut (SAC), characterized mainly by a dilution factor higher than that used before, based on the results of chemical analysis obtained in Chapter 3. In Experiment 1 we evaluated the potential of a cultivation medium with 20% coconut water *in natura*, supplemented only with 10% FBS, pyruvate, and antibiotics (**SAC-20**), to promote the growth of *cumulus oophorus* cells derived from biopsies of immature complex of cumulus-oophorus (COCs). The pH was adjusted with NaHCO₃ and the osmolarity with NaCl and MgSO₄ (280 mOsmol/L). The Control Group was represented by culture in Medium 199. In Experiment 2 was evaluated the potential of the SAC-20, described in Experiment 1, however, supplemented with myo-inositol, tri-sodium citrate, amino acids and BSA (**SAC-20S**), to promote the growth of *cumulus oophorus* cells derived from COCs after 18h of IVM. At this stage the Control Group was represented by culture in SOF medium. In Experiment 1 the SAC-20 was able to promote the cell attachment and growth until the third day of culture, in the 4th day was observed cell death. In Experiment 2 it was observed that the SAC-20S was able in promoting the growth of *cumulus oophorus* cells, for a period of 7 days, with similar characteristics to the Control Group. Therefore, the new formulation for the SAC, established in Experiment 2, was able to promote the growth of *cumulus oophorus* cells within the patterns expected for the co-culture systems in PIVE.

1 INTRODUÇÃO

A avaliação química da água de coco *in natura* realizada no Capítulo 3 demonstraram características inadequadas em relação às estabelecidas para os sistemas de cultivo na PIVE, justificando o resultado negativo da SAC-75S na PIVE obtido no Capítulo 2. No entanto, a análise da composição química da água de coco *in natura* nos revelam a necessidade e possibilidade de consideráveis ajustes na SAC baseada, principalmente, em um maior fator de diluição.

A determinação da idade do fruto e do fator de diluição foi baseada, principalmente, na redução para níveis mais adequados de glicose e menor perda das propriedades da água de coco. Sendo assim, foram escolhidos frutos com 5 meses maturação e a ACIN passou a representar 20% da constituição da SAC.

A proposta de cultivo de células do *cumulus oophorus* deu-se em função da facilidade e praticidade de obtenção e por serem mais resistentes que os embriões, funcionando assim, como indicadores de viabilidade da SAC-20 como meio de cultivo na PIVE.

1.1 HIPÓTESE

A solução de água de coco a 20% é eficiente em promover o crescimento de células do *cumulus oophorus*.

1.2 OBJETIVO

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a solução de água de coco a 20% no cultivo de células do *cumulus oophorus* bovino.

1.2.2 Objetivos Específicos

Avaliar uma solução de água de coco a 20% em promover o crescimento de células do *cumulus oophorus* oriundas de biópsias de CCOs imaturos.

Avaliar uma solução de água de coco a 20% suplementada com tri-citrato de sódio, mio-inositol e aminoácido em promover o crescimento de células do *cumulus oophorus* oriundas de monocamada após MIV de CCOs

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DE UMA SOLUÇÃO DE ÁGUA DE COCO A 20% (SAC-20) NO CULTIVO DE BIÓPSIAS DE CÉLULAS DO *CUMULUS OOPHORUS* IMATURAS

2.1.1 Composição dos Meios de Cultivo Celular

A SAC-20 foi constituída por 20mL de ACIN, 80mL de água ultra-pura e 220mg de NaHCO_3 . Em função da considerável diluição foram acrescentados 0,46g de NaCl e 9,1mg de MgSO_4 , visando correção da osmolaridade (280 mOsmol/L). Os valores dos sais foram determinados com base nos resultados da avaliação química da água de coco e com referência na fórmula do SOF, por ser o meio mais utilizado no cultivo embrionário em bovinos, tendo em vista que o CIV é um dos principais objetivos deste trabalho.

Tanto o Meio 199 (Grupo Controle) como a SAC-20 foram suplementados com 10% de SFB, 22 $\mu\text{g/mL}$ de piruvato e 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina.

2.1.2 Obtenção de Biópsias de Células do *Cumulus Oophorus* Imaturas

Para obtenção de células do *cumulus oophorus*, ovários bovinos foram obtidos e os folículos aspirados como descrito nos tópicos 2.1.2 e 2.1.3 do Capítulo 2, respectivamente. Os CCOs imaturos selecionados foram biopsiados através de corte da camada de células do *cumulus oophorus* com auxílio de tubo capilar de vidro (Figuras 13 e 14).

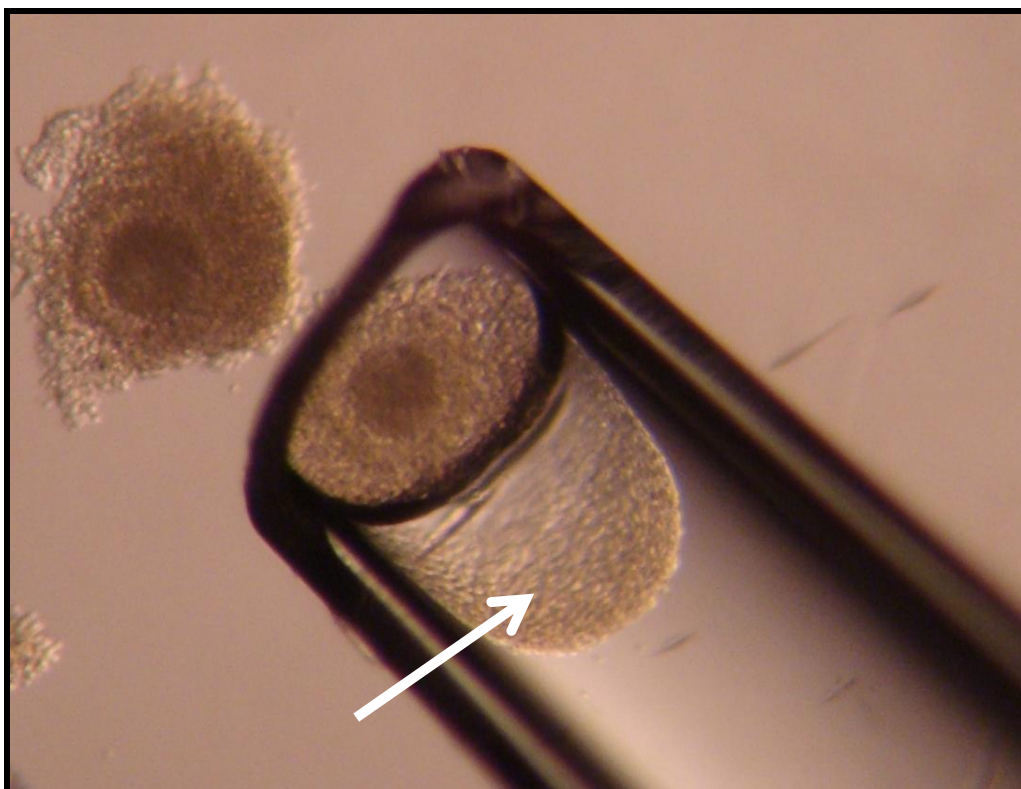


Figura 13: Fotomicrografia demonstrando o método de obtenção das biópsias de células do *cumulus oophorus* (seta) através do corte com auxílio da extremidade do tubo capilar de vidro (120X).

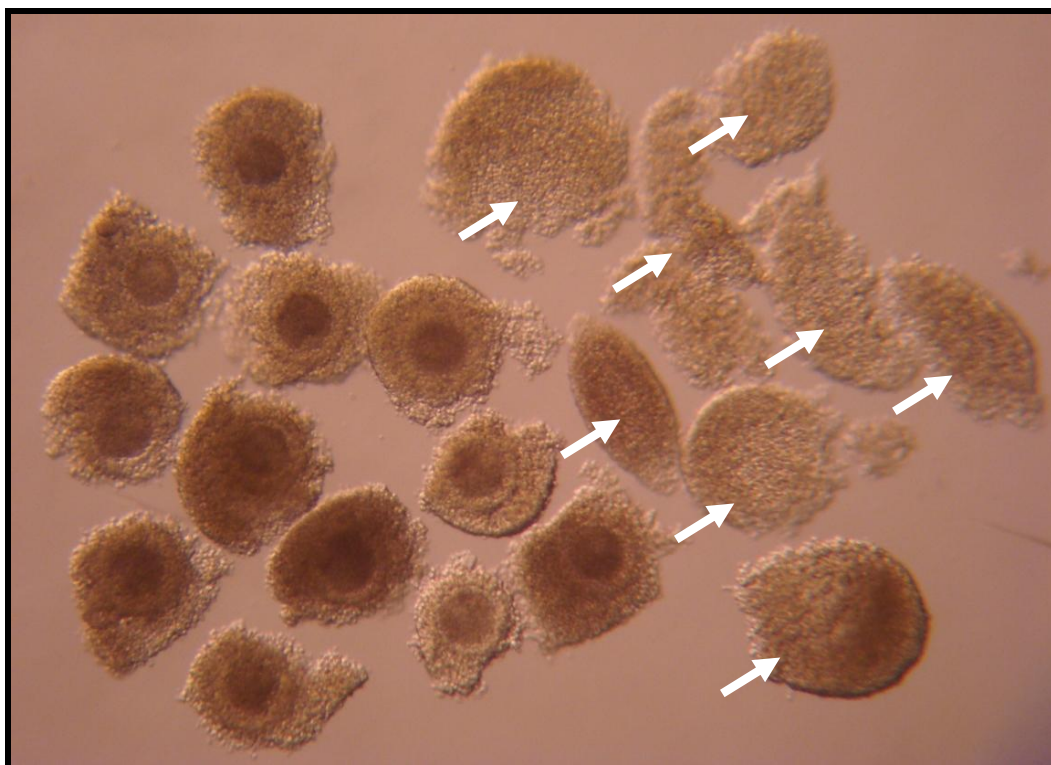


Figura 14: Fotomicrografia de CCOs bovinos e suas respectivas biópsias de células do *cumulus oophorus* indicadas pelas setas (60X).

2.1.3 Delineamento Experimental

As biópsias foram distribuídas, aleatoriamente, em placas de petri (TPP-30x10mm) contendo 2 mL de Meio 199 ou SAC-20. O cultivo foi realizado em estufa de CO₂, à 38.5°C e alta umidade, sendo o meio de cultivo renovado a cada dois dias por um período de 8 dias.

2.1.4 Avaliação do Crescimento Celular

As avaliações da SAC-20 em promover o crescimento celular foram realizadas no segundo, quarto e oitavo dias de cultivo, com auxílio de um microscópio invertido³⁷, através da observação de características morfológicas como aderência a placa e estado de confluência.

2.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DE UMA SOLUÇÃO DE ÁGUA DE COCO A 20% SUPLEMENTADA COM MIO-INOSITOL, TRI-CITRATO DE SÓDIO E AMINOÁCIDOS (SAC-20S) NO CULTIVO MONOCAMADA DE CÉLULAS DO *CUMULUS OOPHORUS* MATURAS.

2.2.1 Composição dos Meios de Cultivo Celular

A SAC-20S foi constituída pela SAC-20 acrescida de 1mL de MEM, 3mL de BME, 37,6mg de glicina, 2,925mg de L-glutamina, 50mg mio-inositol e 10mg tri-citrato de sódio para uma solução com volume final de 100 mL

Nesta etapa o Grupo Controle foi representado pelo cultivo em meio SOF. Tanto o SOF como a SAC-20S foram enriquecidos com 10% de SFB, 6mg/mL de BSA, 80µg/mL de piruvato e 50µg/mL de gentamicina.

³⁷ Nikon (Eclipse TE-300)

2.2.2 Obtenção da Monocamada de Células do *Cumulus Oophorus* Maturas

Nesta etapa foram utilizadas monocamadas de células do *cumulus oophorus* obtidas e mantidas sob as mesmas condições em que são empregadas para dar suporte ao desenvolvimento embrionário, como descrito no tópico 2.1.5 do Capítulo 2, com o objetivo de tornar essa avaliação mais semelhante às condições estabelecidas para o CIV de embriões.

2.2.3 Delineamento do Experimental

As gotas de cultivo, apenas com as monocamadas de células do *cumulus oophorus* que aderiram ao fundo da placa (Figura 15), após 20h de maturação dos CCOs, tiveram o meio de MIV substituído por 100µL de SAC-20S ou meio SOF. A placa permaneceu na estufa de CO₂ por um período de sete dias, sem renovação dos meios.

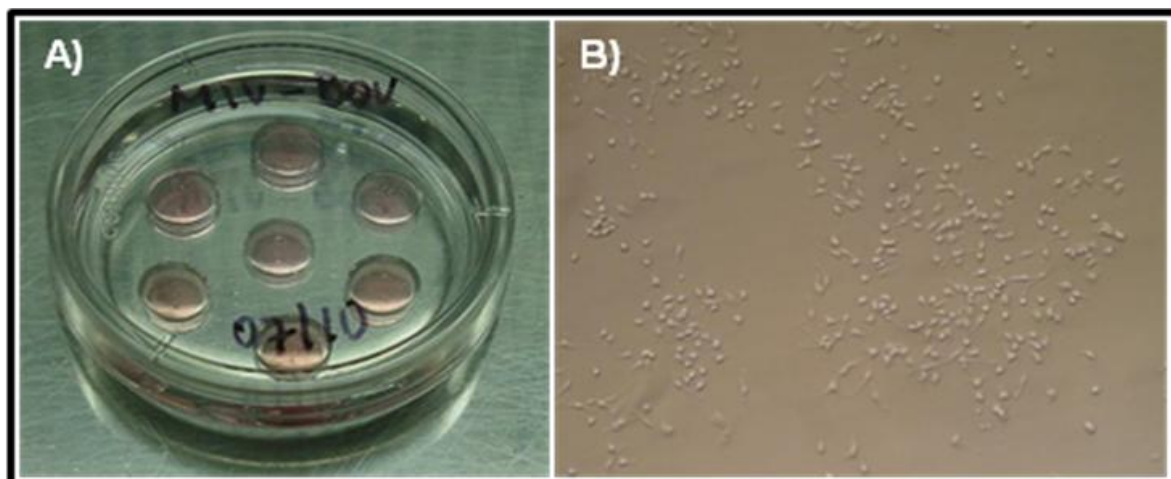


Figura 15: Sistema de cultivo de gametas e embriões: A- placa de MIV com gotas de meio de cultivo sob óleo mineral; B- fotomicrografia da monocamada de células do *cumulus oophorus* que aderiram à placa durante o processo de MIV dos CCOs (100X).

2.2.4 Avaliação do Crescimento Celular

A avaliação da SAC-20S em promover o crescimento celular foi realizada através da observação de características morfológicas como aderência a placa, estado de confluência e pela observação do número inicial e final de núcleos. Para isso, uma das amostras cultivadas com SAC-20S foi marcada com 10µg/mL de fluorocromo hoechst 33342³⁸, no primeiro dia de cultivo, e observada sob microscópio óptico invertido com epifluorescência. As amostras restantes foram marcadas após sete dias de cultivo *in vitro* em SAC-20S.

³⁸ Sigma B-2261

3 RESULTADOS

3.1 EXPERIMENTO 1

O cultivo de células do *cumulus oophorus* em SAC-20 apresentou adesão e expansão celular, aparentemente normal, durante os dois primeiros dias de cultivo em comparação com o Meio 199, indicando a influência positiva do fator de diluição adotado como podemos observar nas Figuras 16 e 17.

Entretanto, a partir do terceiro dia observou-se bloqueio do crescimento, com as células apresentando morfologia alterada (arredondadas), culminado com o descolamento e fragmentação como mostram as Figuras 18, 19 e 20. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Aprício (2003) quando cultivou fibroblastos caprinos em água de coco *in natura*, com pH e/ou osmolaridade ajustadas, suplementada com 10% de SFB e glutamina.

Entretanto, neste experimento foi avaliado um fator maior de diluição da água de coco, visando à correção de alguns constituintes, e isso pode ter interferido na disponibilidade de outros fatores, como os aminoácidos, que são essenciais para manter a viabilidade e promover o crescimento celular.



Figura 16: Fotomicrografia de biópsia de *cumulus oophorus* aderida a placa no segundo dia de cultivo em Meio 199 (130X).

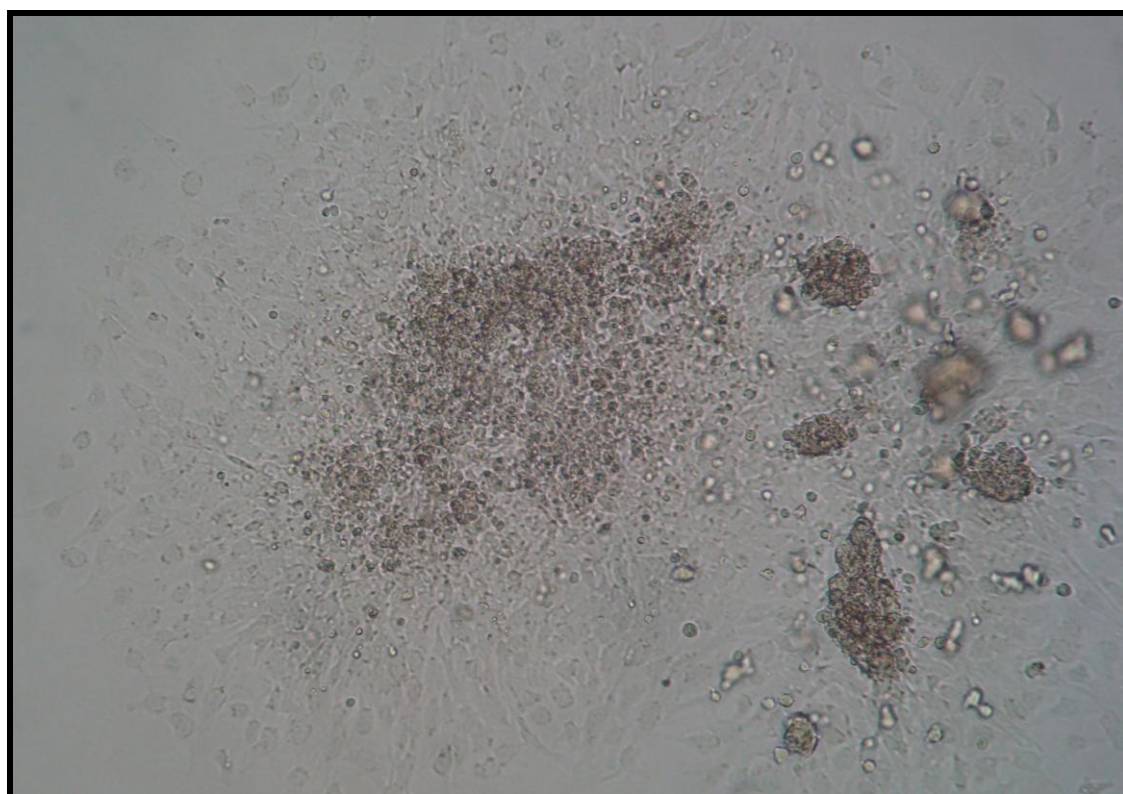


Figura 17: Fotomicrografia de biópsia de *cumulus oophorus* no segundo dia de cultivo em SAC-20, observar adesão e crescimento celular aparentemente normal (140X).



Figura 18: Fotomicrografia de células do *cumulus oophorus* no quarto dia de cultivo em Meio 199, apresentando características morfológicas e de multiplicação celular padrão para o tipo e condição de cultivo celular (140X).

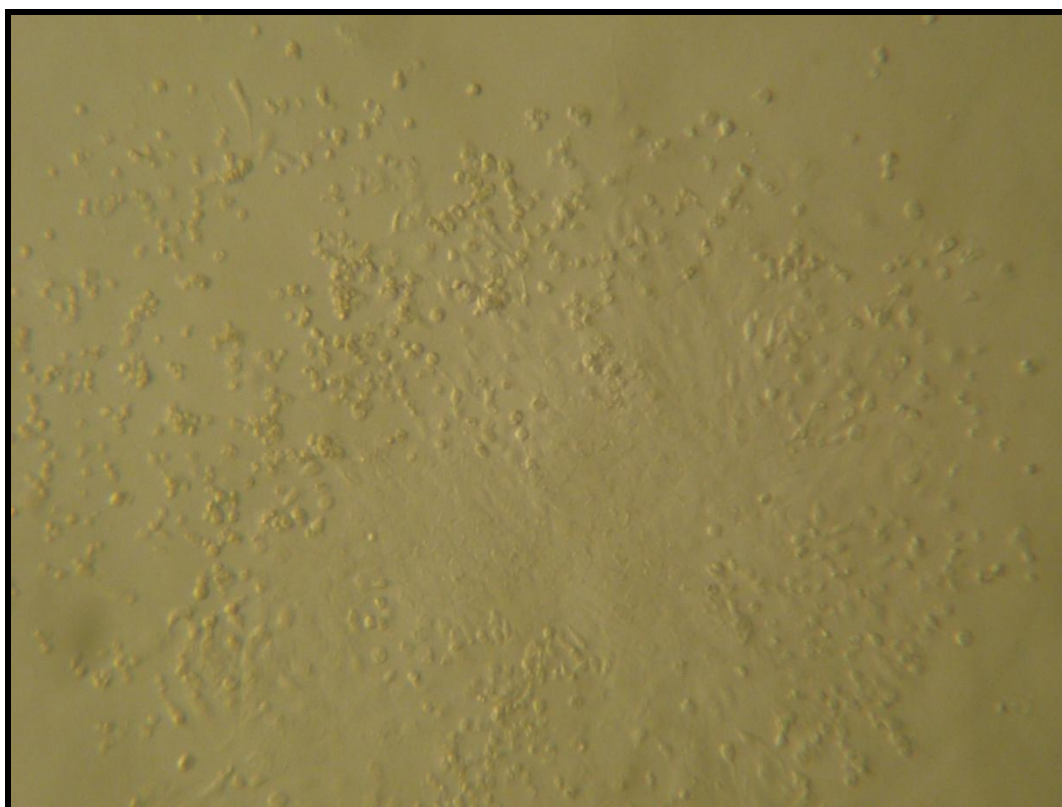


Figura 19: Fotomicrografia de células do *cumulus oophorus* mostrando a perda de adesão celular a partir do quarto dia de cultivo em SAC-20, (130X).

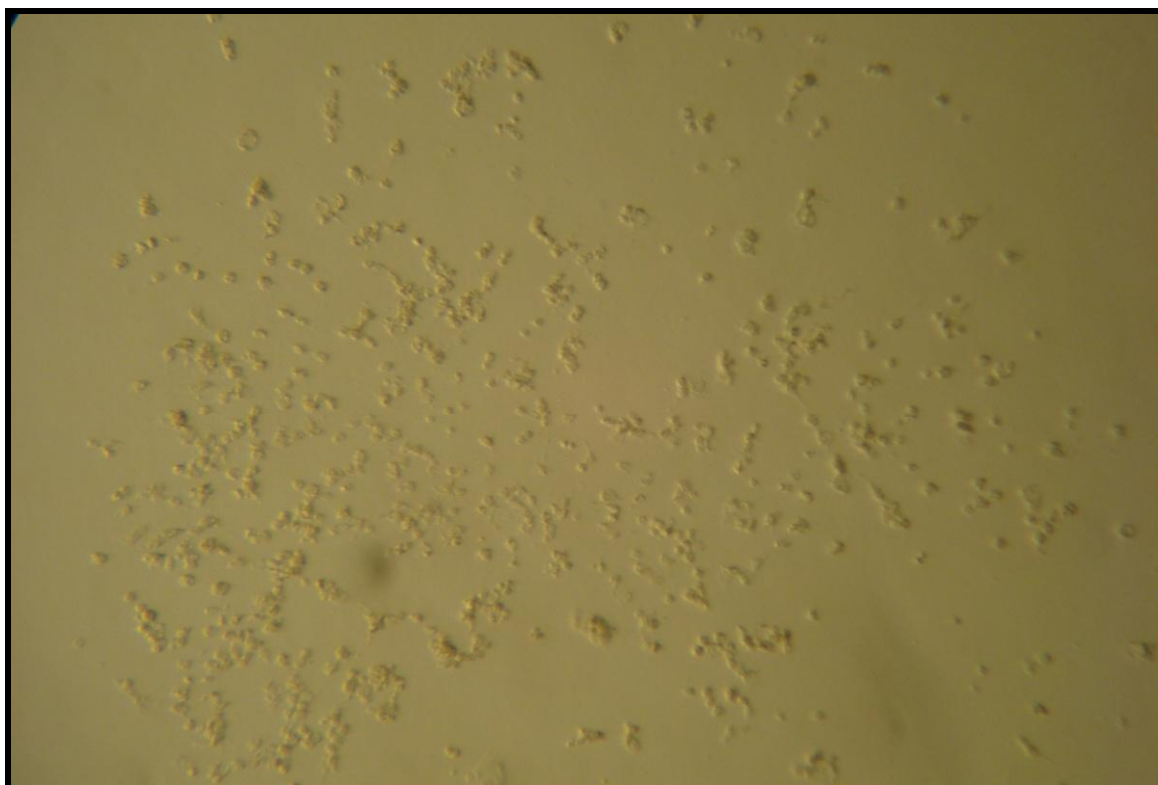


Figura 20: Fotomicrografia de células do *cumulus oophorus* no oitavo dia de cultivo em SAC-20. Observar o descolamento total e fragmentação celular (130X).

3.2 EXPERIMENTO 2

De acordo com as avaliações realizadas no primeiro (Figura 21) e sétimo dias de cultivo (Figura 22), foi possível observar crescimento celular, comprovado pelo estágio de confluência ao atingir as bordas da gota de cultivo (Figura 22-B) e pela quantidade de núcleo celular marcados com hoechst (Figura 22-C) em comparação com o início do cultivo (Figura 21-B), demonstrando que além da diluição, a suplementação com tri-citrato de sódio, mio-inositol e aminoácidos é fundamental para o crescimento das células do *cumulus oophorus* com padrões e

características morfológicas semelhantes às observadas em meio SOF (Grupo Controle).

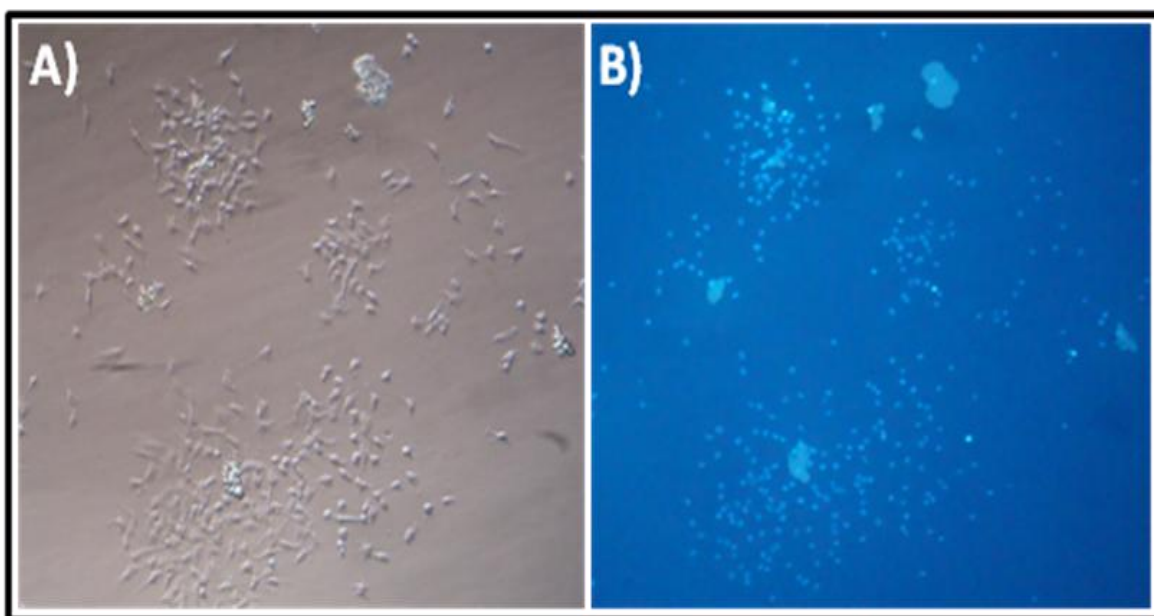


Figura 21: Micrografia da monocamada de células do *cumulus oophorus* no primeiro dia de cultivo em SAC-20S. Observar a baixa densidade celular, comum ao início de cultivo, sob microscopia óptica de luz (A) e fluorescência (B) (100X).

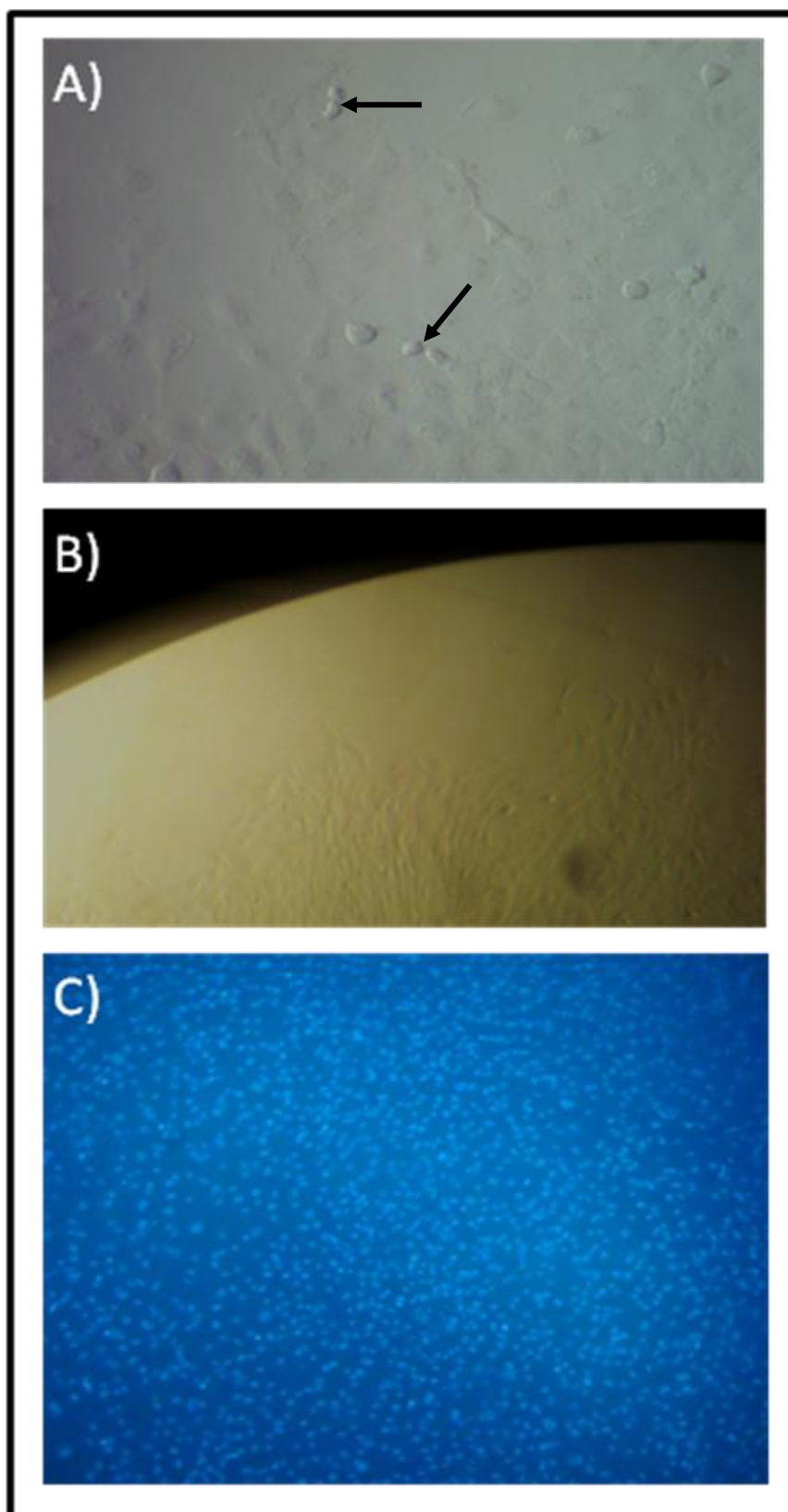


Figura 22: Fotomicrografia da monocamada de células do *cumulus oophorus* no sétimo dia de cultivo em SAC-20S. Na imagem A (400X) observar os eventos de citocinese (setas) indicando a ocorrência de multiplicação celular, comprovado pelo estado de confluência, com ocupação de 80% da superfície da placa, e quantidade de núcleos celulares marcados com fluorocromo hoechst (B e C - 120X).

4 CONCLUSÕES

A solução de água de coco a 20% sem suplementação foi eficiente em promover adesão e crescimento de células do *cumulus oophorus* oriundas de biópsias de CCOs imaturos por um período de até 3 dias.

A solução de água de coco a 20% suplementada com tri-citrato de sódio, mio-inositol e aminoácido foi eficiente em promover o crescimento de células do *cumulus oophorus*, oriundas de CCOs pós MIV, com padrões semelhantes ao observado no Grupo Controle.

CAPÍTULO 5

**AVALIAÇÃO DE UMA SOLUÇÃO DE
ÁGUA DE COCO A 20% SUPLEMENTADA
COM MIO-INOSITOL, TRI-CITRATO DE
SÓDIO E AMINOÁCIDOS NA
MATURAÇÃO OOCITÁRIA,
FECUNDAÇÃO E CULTIVO DE
EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO***

RESUMO

O objetivo deste capítulo foi avaliar uma solução de água de coco composta por 20% de ACIN, suplementada com mio-inositol, tri-citrato de sódio e aminoácidos (SAC-20S) durante os processos de maturação oocitária, fecundação e cultivo embrionário *in vitro*. Para isso CCOs bovinos obtidos de ovários oriundos de abatedouro foram distribuídos aleatoriamente entre os seguintes Grupos experimentais: **Controle**, representado pela MIV em Meio 199, FIV e CIV em SOF; **M-Coco**, MIV em SAC-20S, FIV e CIV em SOF; **M-SOF**, MIV, FIV e CIV em SOF; **F-Coco**, MIV em Meio 199, FIV em SAC-20S e CIV em SOF e o **C-Coco**, MIV em Meio 199, FIV em SOF e CIV em SAC-20S. As taxas de pró-núcleo, clivagem, blastocisto, cinética do desenvolvimento e os dados da expressão gênica foram submetidos à ANOVA (pós-teste Bonferroni, nível de significância 5%). Não foi observada formação pró-nuclear e nem clivagem no Grupo F-Coco (0%), revelando a SAC-20S como um agente bloqueador do processo de fecundação *in vitro* em bovinos. As taxas de formação de blastocisto dos Grupos Controle ($41,60 \pm 7,9$), M-coco ($36,02 \pm 8,8$) e M-SOF ($35,97 \pm 7,7$) foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) do Grupo C-coco (0%). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à cinética do desenvolvimento e expressão relativa dos genes GLUT-1 e OCT-4 entre os Grupos Controle, M-Coco e M-SOF. Em relação à expressão do IFN- τ , houve diferença ($p < 0,05$), apenas entre o Grupo Controle (1) e o Grupo M-SOF ($0,186 \pm 0,091$). Portanto a SAC-20S mostrou resultado positivo apenas quando utilizada durante o processo de MIV.

ABSTRACT

The purpose of this chapter was to evaluate a solution of coconut water with 20% of ACIN, supplemented with myo-inositol, tri-sodium citrate and amino acids (SAC-20S) during the process of oocyte maturation, fertilization and embryo culture *in vitro*. For that, bovine COCs obtained from ovaries get at slaughterhouse were randomly distributed among the following groups: **Control**, represented by IVM in the medium 199 and IVF and IVC in SOF; **M-Coco**, IVM in SAC-20S and IVF and IVC in SOF; **M-SOF**, IVM, IVF and IVC in SOF; **F-Coco**, IVM in medium 199, IVF in SAC-20S and IVC in SOF and the **C-Coco**, IVM in Medium 199, IVF in SOF and IVC in SAC-20S. The rates of pronucleus, cleavage, blastocyst, kinetics of the development and data of gene expression were analyzed by ANOVA (Bonferroni post-test, significance level 5%). There was no pro-nuclear formation nor cleavage in Group F-Coco (0%), showing that the SAC-20S blocked the process of in vitro fertilization. The blastocyst formation rates of the control group (41.60 ± 7.9), M-coconut (36.02 ± 8.8) and M-SOF (35.97 ± 7.7) were different ($p < 0.05$) from Group C- coco (0%). There was no significant difference ($p > 0.05$) in relation to the kinetics of development and relative gene expression OCT-1 and GLUT-4 between the Control Group, M-Coco and M-SOF. Regarding the expression of IFN- τ , there was no difference ($p < 0.05$) only between the Control Group (1) and Group M-SOF (0.186 ± 0.091). Therefore SAC-20S showed positive results only when used during the IVM.

1 INTRODUÇÃO

A proposta de utilização da água de coco como meio de cultivo celular na PIVE em bovinos, baseou-se no relato de vários trabalhos que a apontavam como uma substância rica em aminoácidos, lipídios e carboidratos (SANTOSO et al., 1996; NUNES & COMBARNOUS, 1994 apud NUNES, 1998, SILVA, et al. 2009), capaz de promover a manutenção da viabilidade celular de espermatozóides (NUNES, 1997), folículos ovarianos pré-antrais bovino *in situ* (LUCCI et al., 2004), complexos *cumulus-oócito* bovino (CORDEIRO et al., 2006) e, principalmente, por alguns autores terem relatado sucesso na sua utilização como meio de maturação e cultivo de embriões bovinos (BLUME et al., 1997a,b).

Por outro lado, a análise química comparativa de alguns constituintes da ACIN com o Meio 199, realizadas neste trabalho (Capítulo 3), revelou uma composição muito diferente das estabelecidas para meios de cultivo utilizados para promover o crescimento celular, apontando a necessidade de consideráveis ajustes na SAC na tentativa de torná-la mais semelhantes aos meios de cultivo empregados na PIVE.

Nesse sentido foram realizados vários ajustes na SAC e os resultados dessa nova formulação, obtidos no Capítulo 4, revelaram crescimento das células do *cumulus oophorus* com características semelhantes as observadas com os meios de PIVE padrão. Estes resultados positivos nos incentivaram a avaliar a SAC, sob nova formulação, durante os processos de maturação oocitária, fecundação e cultivo embrionário *in vitro*.

1.1 HIPÓTESE

A solução de água de coco a 20% suplementada com mio-inositol, tri-citrato de sódio e aminoácidos é eficiente na maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de embriões bovinos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar uma solução de água de coco a 20% suplementada com mio-inositol, tri-citrato e aminoácidos (SAC-20S) durante os processos de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de embriões bovinos.

1.2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a taxa de formação pró-nuclear 16h após fecundação *in vitro* em SAC-20S.

Avaliar o potencial de desenvolvimento embrionário, de CCOs maturados, fecundados e cultivados em SAC-20S, através das taxas de clivagem, formação de blastocisto, cinética do desenvolvimento embrionário e análise da expressão dos genes GLUT-1, OCT-4 e IFN- τ dos embriões produzidos *in vitro*.

2 MATERIAL E METODOS

2.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

2.1.1 Maturação *In Vitro*

Os COCs, obtidos e selecionados de acordo com os métodos já descritos nos tópicos 2.1.1 e 2.1.2 do Capítulo 2, foram submetidos ao processo de maturação em Meio 199, SAC-20S ou SOF (suplementado com 5mM de glicose¹³). O emprego do SOF mostrou-se necessário em função do mesmo ter sido utilizado como meio referência na construção da SAC-20S.

As condições de incubação, bem como a suplementação dos meios de maturação com SFB, hormônios, antioxidantes, fatores de crescimento, piruvato e antibióticos foram as mesmas descritas no tópico 2.1.3 do Capítulo 2.

2.1.2 Fecundação *In Vitro*

Todo o processamento do sêmen, que envolve descongelação, métodos de separação e determinação da concentração espermática, foi realizado de acordo com tópico 2.1.4 do Capítulo 2.

Após 18 horas de MIV, CCOs (20 a 25 por gota) e SPTZ foram co-incubados em gotas (80 μ L) com meio de fecundação SOF (sem glicose) ou SAC-20S, acrescidos com heparina, penicilamina, hipotaurina, epinefrina, BSA, piruvato e gentamicina nas mesmas concentrações descritas no tópico 2.1.4 do Capítulo 2.

2.1.3 Cultivo *In Vitro* dos Embriões

Para dar suporte ao desenvolvimento embrionário foi realizado um sistema de co-cultivo dos embriões com monocamada de células do *cumulus oophorus* que aderirem à placa durante a MIV como descrito no tópico 2.1.5 do Capítulo 2.

Após o período de FIV os prováveis zigotos foram submetidos a sucessivas pipetagens para retirada das células do *cumulus oophorus* e então transferidos para gotas de CIV de acordo com o grupo experimental. Foram utilizados como meio de cultivo o SOF (1 mM de glicose) e a SAC-20S, ambos suplementados com SFB, BSA, piruvato e antibiótico como descrito no tópico 2.1.5 do Capítulo 2.

2.1.4 Delineamento Experimental

Foram realizadas 5 repetições com 20 a 25 CCOs por grupo. Os grupos experimentais foram caracterizados pelo meio de maturação, fecundação ou cultivo embrionário ao qual foram submetidos em cada etapa do processo de PIVE. Sendo o **Grupo Controle** representado pela MIV em Meio 199, FIV e CIV em SOF; o **Grupo M-Coco** pela MIV em SAC-20S, FIV e CIV em SOF; o **Grupo M-SOF** pela MIV, FIV e CIV em SOF; o **Grupo F-Coco** pela MIV em Meio 199, FIV em SAC-20S e CIV em SOF e o **Grupo C-Coco** pela MIV em Meio 199, FIV em SOF e CIV em SAC-20S (Tabela 3). Outras combinações como a PIVE totalmente em SAC-20S não compunham esse delineamento pela quantidade limitada de CCOs que são obtidos por repetição.

Tabela 3: Delineamento experimental

Grupos	Maturação			Fecundação		Cultivo Embrionário	
	Meio 199	SAC-20S	SOF	SOF	SAC-20S	SOF	SAC-20S
Controle	X			X		X	
M-Coco		X		X		X	
M-SOF			X	X		X	
F-Coco	X				X	X	
C-Coco	X			X			X

M-Coco= Maturação oocitária em SAC-20S; M-SOF= Maturação em meio SOF; F-Coco= Fecundação em SAC-20S; C-Coco= Cultivo embrionário em SAC-20S

2.1.5 Avaliação da Fecundação *In Vitro*

A fecundação foi avaliada através da taxa de formação pró-nuclear. Para isso, amostras dos Grupos **Controle** e **F-Coco**, após 16h do início da fecundação, foram desnudados por sucessivas pipetagens e fixados em solução de etanol³⁹ e ácido acético⁴⁰ (3:1, respectivamente) para posterior avaliação sob microscópio óptico⁴¹. As amostras foram marcadas com solução de orceína⁴² 1%, sendo considerados fecundados aqueles que apresentaram dois (Figura 23) ou mais pró-núcleos.

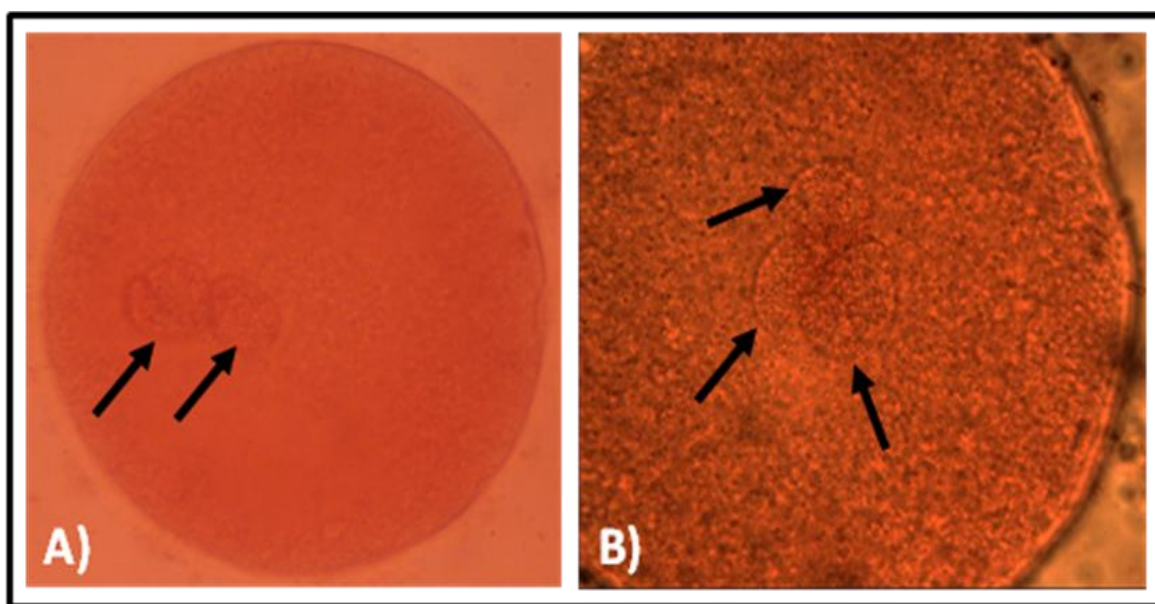


Figura 23: Fotomicrografia de zigotos bovinos após 16h de fecundação corados com orceína 1% para análise da formação pró-nuclear. Nas imagens A (400X) e B (1000X) são observados dois e três pró-núcleos, respectivamente.

³⁹ Nuclear

⁴⁰ Merck

⁴¹ Nikon (Eclipse 50i)

⁴² Merck

2.1.6 Avaliação do Desenvolvimento Embrionário *In Vitro*

O desenvolvimento embrionário foi avaliado de acordo com a taxa de clivagem e formação de blastocisto (segundo e sétimo dias de cultivo *in vitro*, respectivamente), segundo critérios estabelecidos pelo *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões - IETS* (STRINGFELLOW & SEIDEL 1999).

No sétimo dia de cultivo os embriões, também, foram avaliados com relação à cinética do desenvolvimento, para isso os mesmos foram classificados, de acordo com o estágio do desenvolvimento, em blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido (Figura 24).

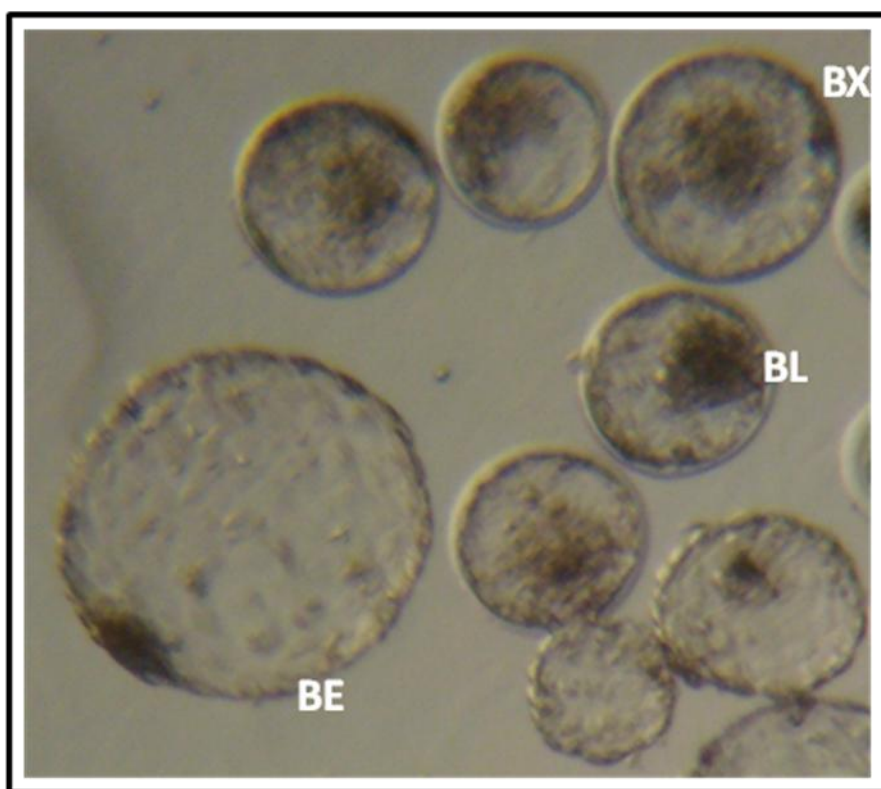


Figura 24: Fotomicrografia de embriões bovinos em diferentes estágios do desenvolvimento (blastocisto (BL), blastocisto expandido (BX) e blastocisto eclodido (BE) no sétimo dia de cultivo *in vitro*.

Os embriões produzidos em cada Grupo Experimental foram avaliados qualitativamente em relação à expressão de genes importantes para o desenvolvimento embrionário: o Transportador de Glicose isoforma 1 (GLUT-1), relacionado ao metabolismo de carboidratos; o Octâmero 4 (OCT-4), que codifica um fator de transcrição importante para a manutenção da totipotência e o Interferon-tau (IFN- τ), importante para a sinalização materno-fetal.

Os embriões obtidos no sétimo dia de desenvolvimento foram armazenados em solução de RNA *later* (5 embriões/5 μ L) e estocados em freezer -20°C até o momento da extração do RNA. O RNA total foi extraído utilizando o kit RNeasy Micro (Qiagen, Valencia, CA). O RNA foi tratado com DNase I (fornecida pelo kit de extração) a fim de evitar contaminação por DNA genômico. Após a extração o RNA total foi quantificado no equipamento Nanodrop e equalizado. Para a obtenção do cDNA foi utilizado o kit High Capacity Reverse Transcription (Applied Biosystems, CA), de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras de cDNA dos embriões foram analisadas utilizando um ensaio de quantificação relativa por PCR em tempo real (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems). Em todas as reações de PCR foi utilizado para detecção do DNA o corante SYBR Green (Power SYBR Green® PCR Master Mix, Applied Biosystems).

As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores (Promega, Madison, WI) utilizados na análise da expressão dos genes “alvo” (GLUT-1, OCT-4 e IFN- τ) e controle endógeno, H2A.Z (ROBERT et al., 2002) estão descritos na Tabela 4.

As amplificações dos transcritos estudados foram previamente ajustadas quanto à concentração de *primers*, especificidade e eficiência de amplificação. As

condições de termociclagem foram: 95°C por 10 minutos, 45 ciclos de 95°C por 15 s e 61°C por 1 min.

Tabela 4: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação relativa dos genes, o tamanho do fragmento (pares de base) e seu respectivo código de acesso no GenBank.

Gene	Seqüência	Tamanho (pb)	Genbank
GLUT-1	CTGCTCATTAACCGCAACGA TGACCTTCTTCTCCCGCATC	133	M60448
OCT-4	GGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTC ACACTCGGACCACGTCTTTC	143	NM 174580
IFNτ	TGCCTGGAACACCACCCTC AGG TAG ACA TGG ATA CCC TGG AAG	167	X 65539
H2A.Z	AAAGCGTATTACCCCTCGTCA GAATCCAGGCATCCTTTAGACAG	166	BC109743.1

Foram realizadas três réplicas experimentais, sendo cada uma amplificada individualmente em triplicata utilizando-se o kit Power SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems) em um volume final de reação de 20 μ L.

Após cada corrida de PCR, a análise da curva de desnaturação foi realizada para cada amostra, para detectar dímeros de oligonucleotídeos e produtos inespecíficos. Para garantir a especificidade da amplificação, os tamanhos dos amplicons foram visualizados em um gel de agarose 2%, corado com SybrSafe (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para avaliação a eficiência

das reações os dados de Δ RN foram analisadas no programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003), no qual foi definindo uma janela de linearidade comum para todos os amplicons, que engloba a fase mais linear da reação. Análise de expressão gênica foi realizada utilizando-se o método $\Delta\Delta$ Ct, sendo o Grupo Controle utilizado como calibrador (Pfaffl, 2001).

2.1.7 Análise Estatística

As taxas pró-núcleo, clivagem, blastocisto e cinética do desenvolvimento transformadas para Arcoseno e os dados da análise expressão gênica foram submetidos à análise da variância (ANOVA – pós teste Bonferroni, nível de significância 5%), com auxílio do programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

Para avaliação da SAC-20S como meio de fecundação *in vitro*, através da quantificação pró-nuclear, foram analisadas amostras das 5 repetições de PIVE, totalizando 187 prováveis zigotos, sendo 85 pertencentes ao Grupo Controle e 102 ao Grupo F-Coco.

Embora a água de coco apresente algumas propriedades que favorecem a sobrevivência espermática de várias espécies, o que, também, foi observado neste trabalho, através da observação de motilidade espermática mesmo após 32 h de incubação, a sua utilização como meio de FIV revelou um efeito bloqueador na fecundação. Todos os oócitos analisados encontravam-se no estágio de metáfase II da meiose (Figura 25), não sendo observado, portanto, formação pró-nuclear no Grupo F-Coco (Tabela 5).

Esse bloqueio pode ser uma condição relacionada a presença e a alta concentração dos carboidratos na SAC-20S, uma vez que vários autores já descreveram o efeito inibitório de alguns carboidratos ao processo de fecundação em hamster e rato (DRAVLAND & MORTIMER, 1988; PONCE et al., 1994), camundongos (BOLDT et al., 1989), humanos (MORI et al., 1993) e bovinos (TANGHE et al., 2004a,b).

Um outro fato interessante foi a observação do fenômeno de adesão das células do *cumulus oophorus* à superfície da placa de FIV, após as 32h em SAC-

20S como mostra a Figura 26. Isso revela que a SAC apresenta propriedades que podem induzir ou até mesmos promover maior adesão, podendo ser uma possibilidade interessante de aplicação no estabelecimento de cultivos primários que apresentem dificuldade no processo de aderência. Nesse sentido é importante, também, um estudo mais detalhado da água de coco, na tentativa de determinar que fatores poderiam estar relacionadas a esse fenômeno.

Tabela 5: Taxa de formação pró-nuclear (16h) após fecundação em solução à base de água de coco 20% suplementada com mio-inositol, tri-citrato de sódio e aminoácidos.

Grupos	n	Não Fecundados	Fecundados	
			Monospérmico (%)	Polispérmico (%)
experimentais				
Controle	85	0 ^a	73 (85,88)	12 (14,11)
F-Coco	102	102 ^{b*}	-	-

n= Número amostral; F-Coco= fecundação em SAC-20S; *Todos os oócitos analisados encontravam-se em estágio de metáfase II; ^{a,b} Sobrescritos diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

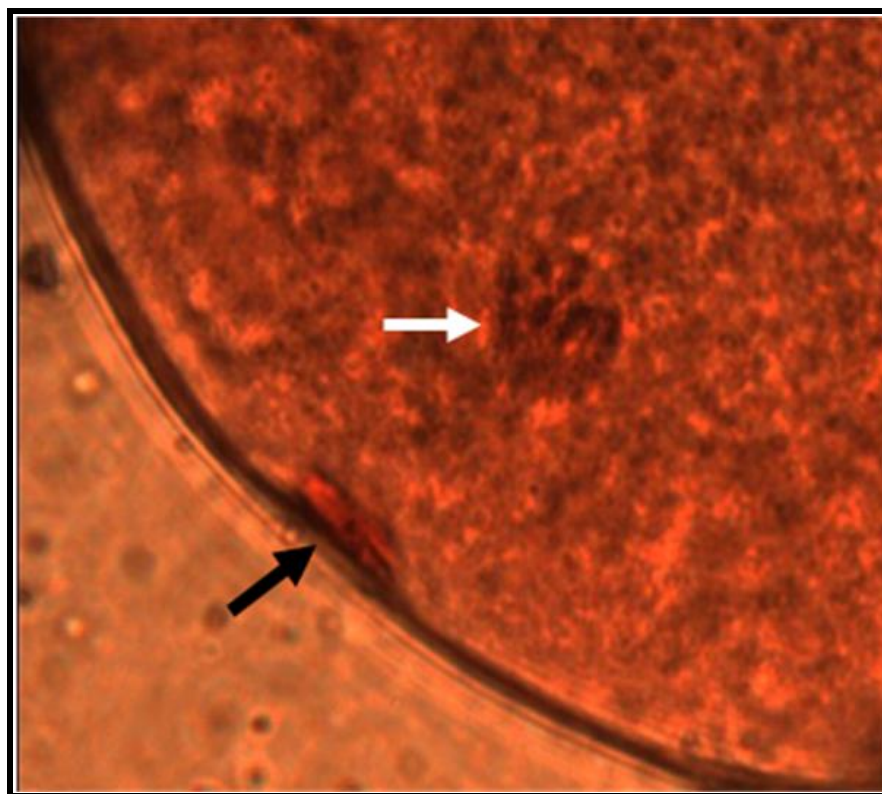


Figura 25: Fotomicrografia de oócito bovino corado com orceína 1%, em estágio de metáfase II, onde podemos observar placa metafásica (seta branca) e primeiro corpúsculo polar (seta preta), após 16h de fecundação em SAC-20S (1000X).

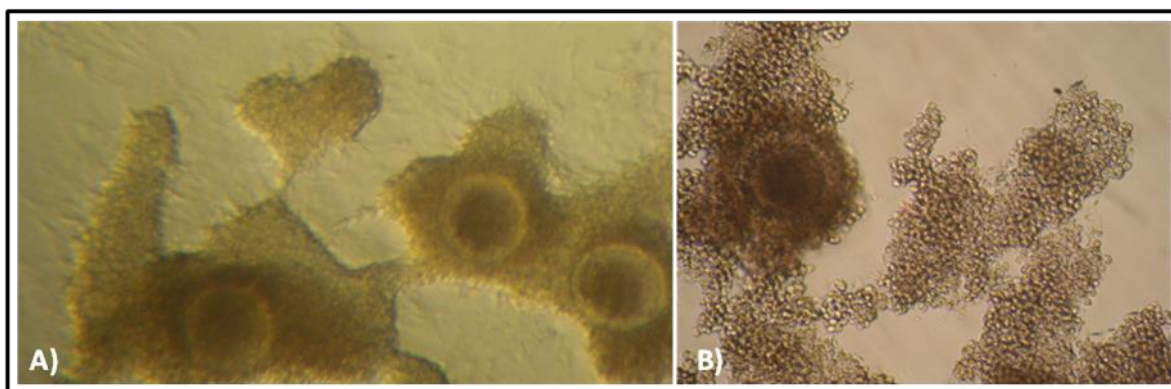


Figura 26: Fotomicrografia da gota fecundação (32h) demonstrando na imagem A (100X) as células do *cumulus oophorus* aderidas à superfície da placa quando submetidas ao processo de FIV em SAC-20S (Grupo F-Coco), característica esta incomum as condições de fecundação padrão como observado na imagem B (120X) do Grupo Controle.

3.2 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO *IN VITRO*

Para avaliação do desenvolvimento embrionário foi utilizado um total de 687 CCOs distribuídos entre os seguintes Grupos experimentais: 137 no Grupo Controle; 136 no Grupo que sofreu maturação em SAC-20S (M-Coco); 139 no Grupo maturado em meio SOF (M-SOF); 138 no Grupo cujo processo de fecundação foi realizado em SAC-20S (F-Coco) e 137 no Grupo onde a SAC-20S foi utilizada como meio de cultivo embrionário (C-Coco).

Em relação às taxas de clivagem houve diferença estatística ($p < 0,05$) apenas do Grupo F-Coco em relação aos demais Grupos experimentais (Tabela 7). No Grupo F-Coco não foram observadas clivagens (Figura 27), corroborando com os resultados obtidos na avaliação da formação pró-nuclear.

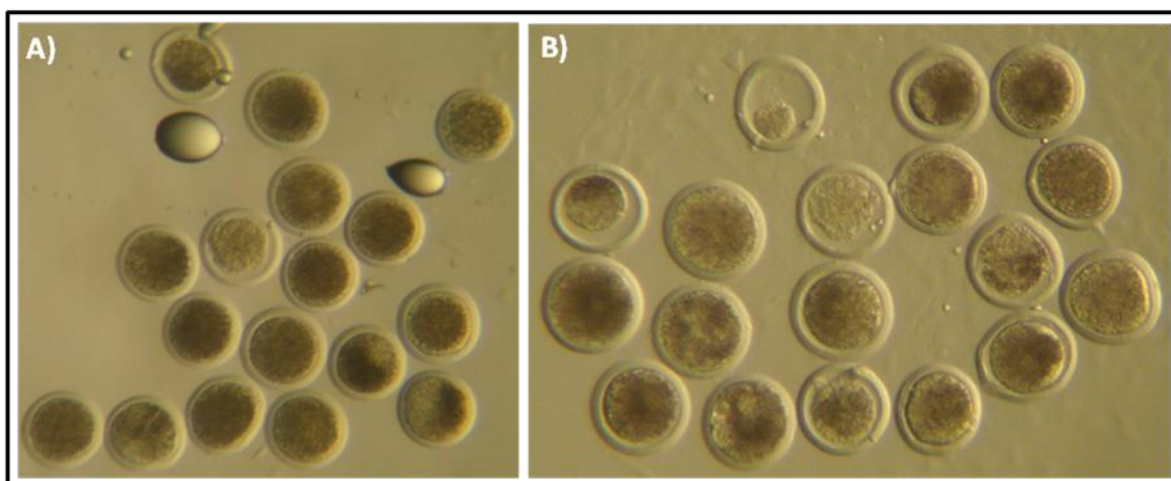


Figura 27: Fotomicrografia do Grupo F-Coco no segundo (A-100X) e sétimo (B-130X) dias de cultivo *in vitro*. Observar ausência de clivagens após FIV em SAC-20S.

Os resultados de formação de blastocisto mostram um efeito positivo do fator de diluição adotado para a elaboração do meio de maturação à base de água de coco, onde ao contrário do observado no Capítulo 2, não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre o Grupo M-Coco ($36,02\pm 8,8$) e os Grupos Controle ($41,60\pm 7,9$) e M-SOF ($35,97\pm 7,7$) (Tabela 6).

Não houve diferença estatística ($p>0,05$), também, com relação à avaliação da cinética do desenvolvimento (Blastocisto= BL; blastocisto expandido= BX e blastocisto eclodido=BE) entre os Grupos Controle ($44,50 \pm 5,86$; $18,18 \pm 15,17$ e $37,32 \pm 22,36$, respectivamente), M-Coco ($42,69 \pm 26,39$; $28,03 \pm 10,89$ e $29,99 \pm 26,33$, respectivamente) e M-SOF ($41,73 \pm 13,10$; $15,98 \pm 19,50$ e $42,29 \pm 23,75$, respectivamente) como mostra a Tabela 6 (Figura 28).

Entretanto, em relação ao emprego da SAC-20S como meio de cultivo embrionário nossos resultados, assim como no Capítulo 2, continuaram negativos e contrários aos obtidos por Blume et al. (1997b), ou seja, não foi observado formação de blastocisto no Grupo C-Coco. E embora tenha sido observado um crescimento aparentemente normal da monocamada de células do *cumulus oophorus*, os embriões apresentavam características morfológicas de perda de integridade de membrana no sétimo dia de cultivo em SAC-20S, como mostra a Figura 29.

Tabela 6: Taxas de clivagem, formação de blastocisto e cinética do desenvolvimento após PIVE em solução à base de água de coco 20% suplementada com mio-inositol, tri-citrato de sódio e aminoácidos (SAC-20S).

Grupos	N	% Clivagem	% Blastocisto	N	Cinética do Des	
experimentais	CCOs	M±DP	M±DP	Embriões	%BL	
					M±DP	
Controle	137	82,61±6,7 ^a	41,60±7,9 ^a	57	44,50 ± 5,86	18,
M-Coco	136	82,50±5,2 ^a	36,02±8,8 ^a	49	42,69 ± 26,39	28,
M-SOF	139	85,78±5,1 ^a	35,97±7,7 ^a	50	41,73 ± 13,10	15,
F- Coco	138	0 ^b	-	-	-	
C-Coco	137	81,05±3,5 ^a	0 ^b	-	-	

M-Coco= Maturação oocitária em SAC-20S; M-SOF= Maturação em meio SOF; F-Coco= Fecundação em SAC-20S; C-Coco= Cultivo embrionário em SAC-20S; n CCOs= Número de complexos *cumulus*-oócitos; M±DP= Média ± Desvio Padrão; ^{a,b} Sobrescritos diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05); BL= Blastocisto; BX= Blastocisto Expandido; BE= Blastocisto Eclodido.

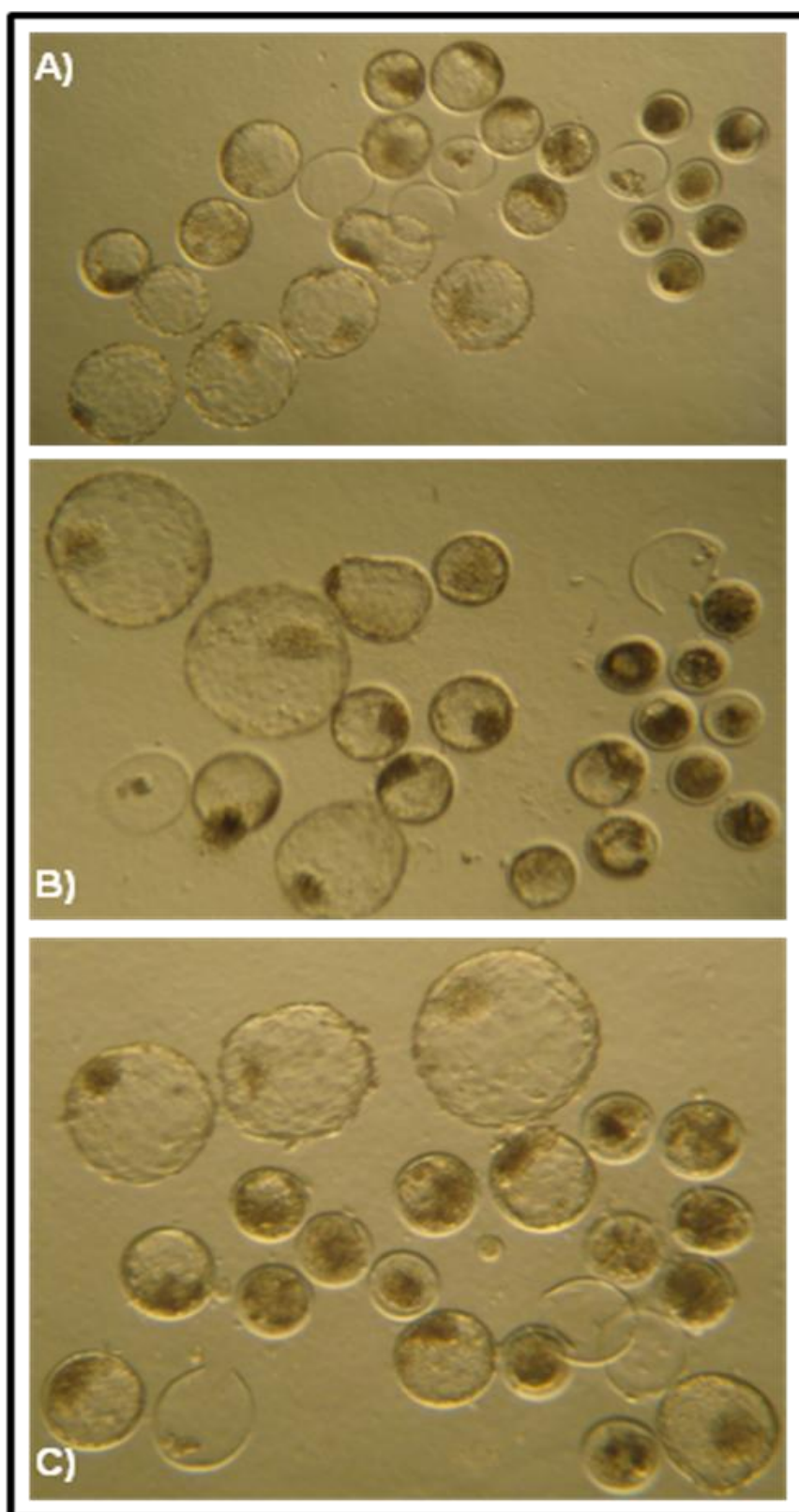


Figura 28: Fotomicrografia dos Grupos Controle (A), M-Coco (B), C-SOF (C) no sétimo dia de cultivo (80X).

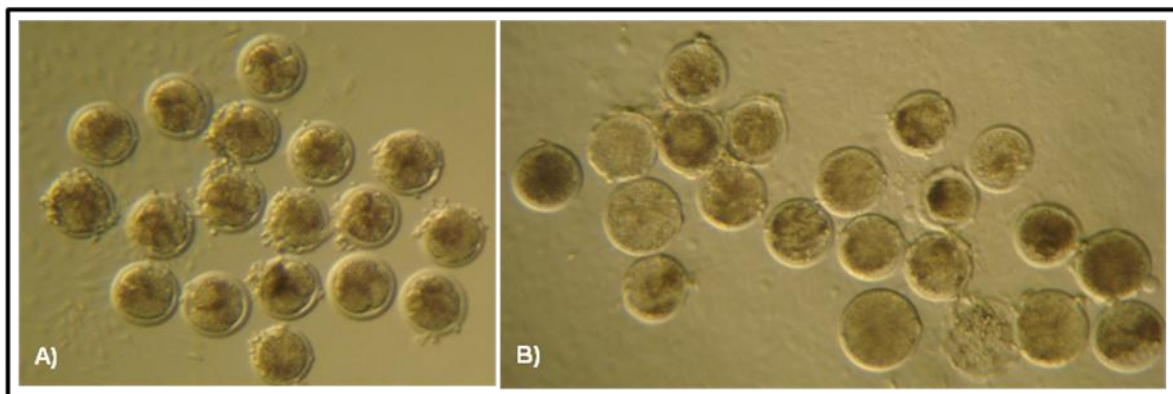


Figura 29: Fotomicrografia do Grupo C-Coco no segundo (A) e sétimo (B) dias de cultivo. Notar na imagem B que, apesar do crescimento aparentemente normal da monocamada de células do *cumulus oophorus*, houve degeneração dos embriões cultivados em SAC-20S (100X).

A avaliação da expressão relativa dos genes GLUT-1, OCT-4 e IFN- τ foi constituída pela análise de três repetições, de embriões oriundos de três rotinas de PIVE. Foram analisados 45 embriões, sendo 15 pertencentes ao Grupo Controle, 15 ao Grupo M-Coco e 15 ao Grupo M-SOF.

Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) na expressão relativa entre o Grupo Controle (1), Grupo M-Coco ($0,896 \pm 0,769$ e $0,748 \pm 0,476$) e o Grupo M-SOF ($1,136 \pm 1,107$ e $1,079 \pm 0,670$) para os transcritos dos genes GLUT-1 e OCT-4, respectivamente (Figuras 30 e 31).

A avaliação da expressão do gene IFN- τ , revelou uma redução significativa ($p < 0,05$) do Grupo M-SOF ($0,186 \pm 0,091$) em relação ao Grupo Controle (1) (Figura 32). Este resultado demonstra que embora o SOF tenha potencial para garantir taxas de blastocistos similares ao Meio 199, fato também observado por Watson et al. (2000), a composição do meio de MIV exerce forte influência no perfil de expressão gênica dos embriões (WATSON et al., 2000; LONERGAN et al., 2003a; SAGIRKAYA et al., 2007; WARZYCH et al., 2007).

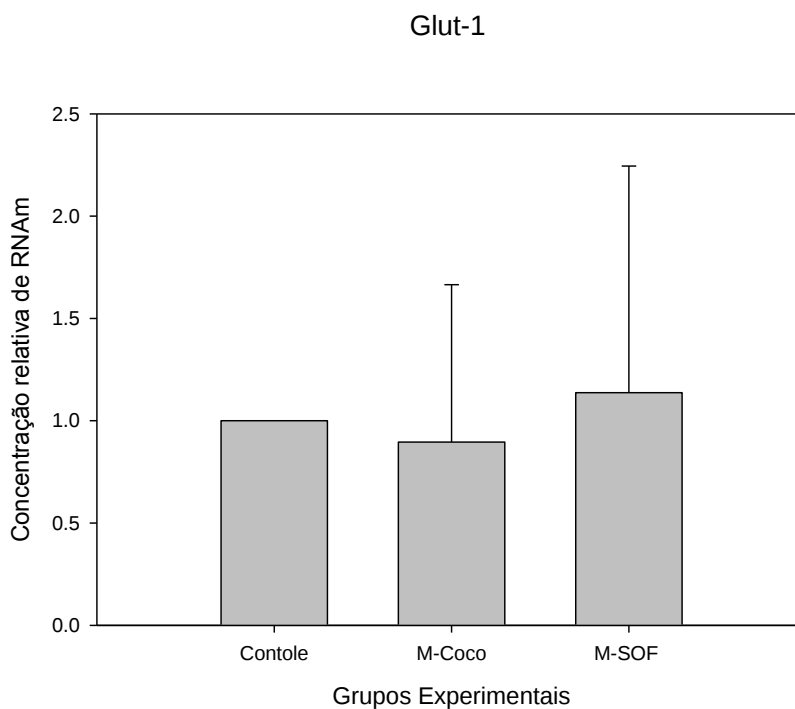


Figura 30: Concentração relativa de transcritos para o gene GLUT-1 (média±desvio padrão) nos embriões oriundos de diferentes meios de maturação.

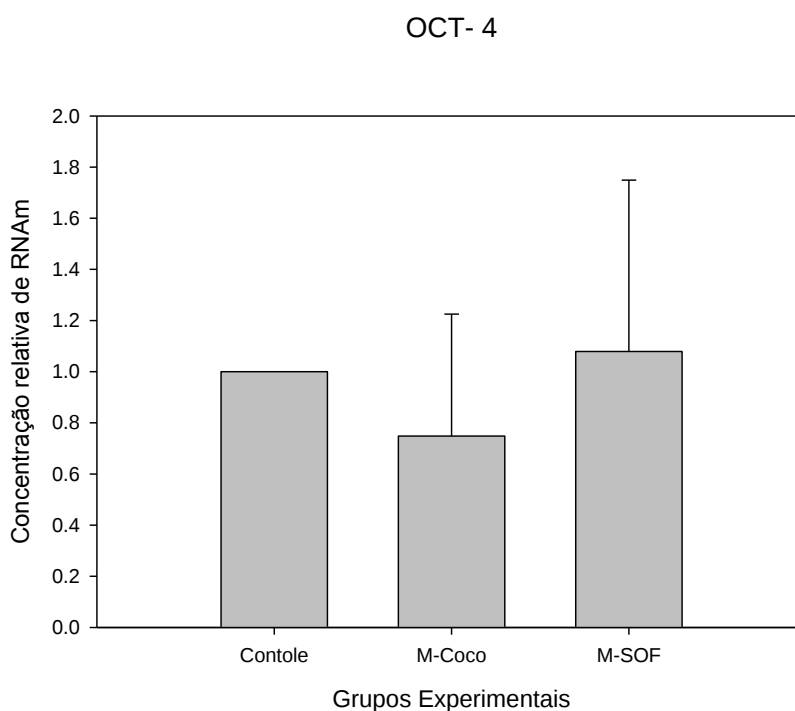


Figura 31: Concentração relativa de transcritos para o gene OCT-4 (média±desvio padrão) nos embriões oriundos de diferentes meio de maturação.

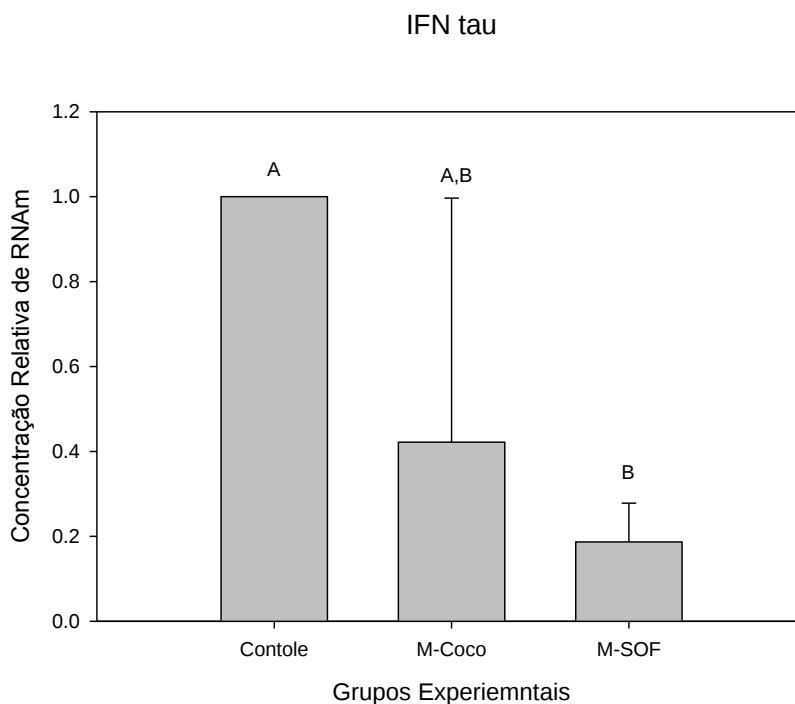


Figura 32: Concentração relativa de transcritos para o gene IFN- τ (média $\pm$ desvio padrão) nos embriões oriundos de diferentes meios de maturação. A, B: Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Embora os critérios de avaliação abordados neste trabalho, como clivagem, formação de blastocisto, cinética e expressão gênica, não tenham determinado nenhuma diferenças na PIVE após maturação oocitária em SAC-20S, mais estudos devem ser realizados no sentido de avaliar o real potencial da SAC-20S meio de maturação, uma vez que estes resultados podem ser fruto da diluição de fatores que acarretam estresse ao metabolismo celular, aliados a resistência e plasticidade dos CCOs, habilidades estas, comprovadas pela eficiência das células do *cumulus oophorus* em proteger o oócito em situações adversas (TATEMOTO et al., 2000; FATEHI et al., 2005).

Outro ponto importante foi a incapacidade da SAC-20S, quando utilizada como meio de CIV, em promover a sobrevivência embrionária. Em função da

água de coco não apresentar uma composição química definida, situação cada vez mais requerida para as condições de cultivo embrionário *in vitro* (OYAMADA et al., 2004; VIREQUE et al., 2009; MOMOZAWA & FUKUDA, 2011), torna-se extremamente complicado e limitante avaliar os reais motivos pelos quais a mesma deflagrou a morte embrionária. Dentro do que é possível especular, e em função da SAC-20S ter proporcionado a sobrevivência é crescimento apenas das células do *cumulus oophorus*, a mesma parece apresentar forte propriedade embriotóxica.

Portanto, embora a água de coco apresente algumas propriedades químicas que viabilizam sua utilização como meio de manutenção (CORDEIRO et al., 2006) e preservação celular, principalmente, de espermatozóides (NUNES, 1997), a sua utilização como meio de cultivo para gametas e embriões é questionável, em função da necessidade e dificuldade da realização de ajustes que visem torná-la mais adequada as condições de cultivo para PIVE.

4 CONCLUSÕES

A solução de água de coco a 20% suplementada com tri-citrato de sódio, mio-inositol e aminoácidos (SAC-20S) bloqueou o processo de fecundação *in vitro* em bovinos.

A SAC-20S, quando utilizada como meio de MIV, foi eficiente em promover maturação oocitária compatível com o desenvolvimento embrionário *in vitro* em bovinos.

A SAC-20S, quando utilizada como meio de CIV, não foi eficiente em promover o desenvolvimento embrionário *in vitro* em bovinos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIAS

ABD EL RAZEK, I.M.; CHARPIGNY, G.; KODJA, S.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; MERMILLOD, P.; GUYADER-JOLY, C.; HUMBLLOT, P.: Differences in lipid composition between *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, 53: 346, 2000.

ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.H.; HIROSHI, H.: Accumulation cytoplasmic lipid-droplets in bovine embryo and cryotolerance of embryo developed in different culture system using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, 61:57-61, 2002.

ALI, A.A.; BILODEAU, J.F. & SIRARD, M.A.A.: Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, 59: 939-949, 2003.

ALVES, D.F.; RAUBER, L.P.; RUBIN, F.B.; BERNARDI, M.L.; DEZEN, D.; SILVA, C.A. M. AND RUBIN, M.I.B.: Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 40: 279-286, 2003

ANBARI, K.; SCHULTZ, R.M.: Effect of sodium and betaine in culture media on development and relative rates of protein synthesis in preimplantation mouse embryos *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, 35: 24-28, 1993.

ANDRADE, E.R.; AMORIM, C.A.; MATOS, M.H.T.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V.; DODE, M.A.N.; FIGUEIREDO, J.R.: Evaluation of saline and coconut water solutions in the preservation of sheep preantral follicles *in situ*. **Small Ruminant Research**, 43: 235-243, 2002.

ANDRADE, E.R.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A.; OLIVEIRA, J.A.; FIGUEIREDO, J.R.: Efeito da concentração de ácido 3-indol acético na ativação e crescimento in

vitro folículos pré-antrais ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e Zootecnia**, 57: 334-339, 2005a.

ANDRADE, E.R.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A.; OLIVEIRA, J.A.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; FIGUEIREDO, J.R.; TONIOLLI, R.: Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. **Theriogenology**, 64: 1104-1113, 2005b.

APRÍGIO, C.J.L.: Utilização da água de coco como meio alternativo para cultivo de células fibroblásticas não infectadas e infectadas com vírus maedi-visna cepa k1514 (mvv-k1514) **Dissertação de mestrado**. Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará, 2003.

ARAGÃO, W.M.; ISBERNER, I.V.; CRUZ, E.M.O.: Água-de-coco. Aracaju: **EMBRAPA CPATC/tabuleiros costeiros**, 2001.

ARAÚJO, A.A.; NUNES, J.F. Utilização da água de coco in natura adicionada de gema de ovo como diluente do sêmen caprino. **Ciência Animal**, 1: 39-49, 1990.

ARAÚJO, L.L.; LIMA, J.S.; OLIVEIRA, K.G.; MUNIZ, J.A.P.C.; VALLE, R.D.R.; DOMINGUES, S.F.S.: Uso de solução à base de água de coco a 37 °C como diluidor de sêmen de *cebus apella* (macaco-prego) mantido em cativeiro. **Ciência Animal Brasileira**, 10: 588-594, 2009

ARIAS-ALVAREZA, M.; BERMEJO-ALVAREZB, P.; GUTIERREZ-ADANB, A.; RIZOSB, D.; LORENZO, P.L.; LONERGAN, P.: Effect of leptin supplementation during in vitro oocyte maturation and embryo culture on bovine embryo development and gene expression patterns **Theriogenology**, 75: 887-896, 2011.

ASHKAR, F.; SEMPLE, E.; SCHMIDT, C.; ST JOHN, E.; BARTLEWSKI, P.M.; KING, W.A.: Thyroid hormone supplementation improves bovine embryo development in vitro. **Human Reproduction**, 25: 334–344, 2009.

AWAD, M. M.: Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, 123: 157-162, 2011.

AYRES, M.; AYRES, M.Jr.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S.: **BIOESTAT 5.0**: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, 2007.

AZEVÊDO, D.M.M.R.; TONIOLLI, R.: Água de coco estabilizada suplementada com antibiótico e ácido 3-indol acético na conservação de sêmen de caprinos marota. **Ciência Animal**, 9: 37-42, 1999.

BALASUBRAMANIAN, S.; SON, W.J.; KUMAR, B.M.; OCK, S.A.; YOO, J.G.; IM, G.S.; CHOE, S.Y.; RHO, G.J.: Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. **Theriogenology**, 68: 265-75, 2007.

BAIN, N.T.; MADAN, P.; BETTS, D.H.: The early embryo response to intracellular reactive oxygen species is developmentally regulated. **Reproduction, Fertility, and Development**, 23: 561-575, 2011.

BARBOSA, C.C.; MADEIRA, V.L.H.; JUCÁ, R.P.; OLIVEIRA, A.C.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M.: Criopreservação de sêmen canino com um diluidor à base de água de coco na forma de pó (acp-106[®]): efeito da temperatura de adição do glicerol (27 e 4°C). **Ciência Animal Brasileira**, 10: 1207-1215, 2009.

BARCELÓ-FIMBRES, M.; SEIDEL GE, J.R.: Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**, 74: 1395-1405, 2007.

BARROS, T.B.: Qualidade espermática do sêmen suíno conservado a baixas temperaturas em diluentes alternativos. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

BAVISTER, B.D; YANAGIMACHI, R.: The effects of sperm extract and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster sperm in vitro. **Biology of Reproduction**, 16: 228-237, 1977.

BAVISTER, B.D.; LEIBFRIED, M.L.; LIEBERMAN, G.: Development of pre-implantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. **Biology of Reproduction**, 28: 235-247, 1983.

BAVISTER, B.D.: Interactions between embryos and the culture milieu. **Theriogenology**, 53: 619-626, 2000.

BEEBE, D.; WHEELER, M.; ZERINGUE, H.; WALTERS E.; RATY, S.: Microfluidic technology for assisted reproduction. **Theriogenology**, 57: 125-135, 2002.

BERMEJO-ALVAREZ, P.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.: Low oxygen tension during IVM improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis. **Reproductive BioMedicine Online**, 20: 341-349, 2010.

BERMEJO-ALVAREZ, P.; PERICUESTA, E.; MIRANDA, A.; DE FRUTOS, C.; PÉREZ-CEREZALES, S.; LUCIO, A.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.: New challenges in the analysis of gene transcription in bovine blastocysts. **Reproduction in Domestic Animals**, 46: 2-10, 2011.

BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; VAN DEN HURK, R. AND IZADYAR, F.: Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, 47: 13-22, 1997.

BHUIYAN, M.M.U.; KANG, S.K.; LEE, B.C.: Effects of fructose supplementation in chemically defined protein-free medium on development of bovine in vitro fertilized embryos. **Animal Reproduction Science**, 102: 137-144, 2007.

BLUME, H.; VALE FILHO, V.R.; MARQUES Jr, A.P.; SATURNINO, H.M.: Avaliação da água de coco na maturação de ovócitos bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 21: 72-75, 1997a.

BLUME, H.; VALE FILHO, V.R.; MARQUES Jr, A.P.; SATURNINO, H.M.: Uso da água de coco no cultivo de embriões bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 21: 78-81, 1997b.

BOLDT, J.; HOWE, A.M.; PARKERSON, J.B.; GUNTER, L.E.; KUEHN, E.: Carbohydrate involvement in sperm-egg fusion in mice. **Biology Reproduction**, 40: 887-896, 1989.

BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CARBONEAU AND J. DUROCHER G.: In vitro embryo production in the cow: an effective alternative To the conventional embryo production approach. **Theriogenology**, 51: 59-70, 1999.

BUCAK, M.N.; BAŞPINAR, N.; TUNCER, P.B.; COYAN, K.; SARIÖZKAN, S.; AKALIN, P.P.; Büyükleblebici, S.; Küçükğünay, S.: Effects of curcumin and dithioerythritol on frozen-thawed bovine semen. **Andrologia**. [Epub ahead of print] 2011.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE FILHO, V.R.: Factors influencing in vitro embryo production. **Animal Reproduction**, 3: 19-28, 2006.

CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J.: Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, 57: 1293-1301, 1997.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M.: Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. **Theriogenology**, 59: 743-751, 2003.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M.: Use of the powdered coconut water (ACP-106) for cryopreservation of canine spermatozoa. **Animal Reproduction**, 2: 257-262, 2005.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M.: Comparison of two dilution rates on canine sêmen quality after cryopreservation in a coconut water extender. **Animal Reproduction Science**, 92: 384-391, 2006.

CARDOSO, R.C.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.; CHIRINÉA, V.H.; SOUZA, F.F.; LOPES, M.D.: Evaluation of fertilizing potential of frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP-106 using an in vitro sperm-oocyte interaction assay. **Reproduction in Domestic Animals**, 42: 11-16, 2007.

CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.; MACHADO, G.M.; MOURÃO, G.B.; DODE, M.A.: Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in vitro embryo production. **Theriogenology**, 74: 1521-30, 2010.

CESARI, A.; KAISER, G.G.; MUCCI, N.; MUTTO, A.; VINCENTI, A.; FORNÉS, M.W.; ALBERIO, R.H.: Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. **Theriogenology**, 66:1185-93, 2006

CLEMENTE, M.; LOPEZ-VIDRIERO, I.; O'GAORA, P.; MEHTA, J.P.; FORDE, N.; GUTIERREZ-ADAN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.: Transcriptome changes at the initiation of elongation in the bovine conceptus. **Biology of Reproduction**, 85: 285-95, 2011.

CORDEIRO, M.S.; SILVA, E.H.S.; MIRANDA, M.S.; BIONDI, F.C.; SANTOS, S.S.D.; OHASHI, O.M.: The use of coconut water solution (*Cocos nucifera*) as a holding medium for immature bovine oocytes for in vitro embryo production. **Animal Reproduction**, 3: 376–379, 2006.

COSTA, S.H.F.; SANTOS, R.R.; FERREIRA, M.A.L.; MACHADO, V.P.; RODRIGUES, A.P.R.; OHASHI, O.M.; FIGUEIREDO, J.R.: Conservação de folículos pre-antrais caprinos em solução salina ou à base de água de coco. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 39: 324-330, 2002.

COSTA, S.H.F.; SANTOS, R.R.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V.; CELESTINO, J.J.H.; MATOS, M.H.T.; ANDRADE, E.R.; MARTINS, F.S.; DANTAS, J.K.; OHASHI, O.M.; FIGUEIREDO, J.R.: In vitro culture of ovine primordial follicles in media supplemented with coconut water. **Animal Reproduction**, 3: 403–409, 2006.

COSTA, N.N.: Efeito da triiodotironina na maturação in vitro de oócitos bovinos: avaliação do desenvolvimento, morfologia e expressão gênica de embriões bovinos. **Dissertação de Mestrado**. Belém, Universidade Federal do Pará, 2010.

CROSIER, A.E.; FARIN, P.W.; DYKSTRA, M.J.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, C.E.: Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. **Biology of Reproduction**, 64: 1375–1385, 2001.

CRUZ, J.F.: Conservação e fertilidade do sêmen ovino mantido a temperatura de 4°C por um período de 48 horas diluído em frações ativas da água de coco. **Dissertação de mestrado**. Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará Ceará, 1994.

CURRY, E.; PRATT, S.L.; LAPIN, D.R.; GIBBONS, J.R.: Efficacy of a commercially available post-thaw bovine semen sexing kit in both single-ovulating and hyperstimulated cows. **Animal Reproduction Science**, 116: 376-380, 2009.

DE OLIVEIRA, A. T. D., LOPES, R. F. L., RODRIGUES, J; L.: Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro under varying embryo density conditions. **Theriogenology**, 64: 1559–1572, 2005.

DONNAY, I.; VAN LANGENONCKT, A.; AUQUIER. P.; GRISART, B. VANSTEENBRUGGE, A.; MASSIP, A. AND DESSY, F.: Effects of co-culture and embryo number on the in vitro development of bovine embryos. **Theriogenology**, 47: 1549-1561, 1997.

DONNAY, I.; FEUGANG, J.M.; BERNARD, S.; MARCHANDISE, J.; PAMPFER, S.; MOENS, A.; DESSY, F.: Impact of adding 5.5 mM glucose to SOF medium on the development, metabolism and quality of in vitro produced bovine embryos from the morula to the blastocyst stage. **Zygote**, 10: 189-199, 2002.

DRAVLAND, J.E.; MORTIMER, D.: Role for fucose-sulfate-rich carbohydrates in the penetration of zona-pellucida-free hamster eggs by hamster spermatozoa. **Gamete Research**, 21: 353-358, 1988.

DUA, L.S. AND CHANDRA, M.: The identification and isolation of plant growth regulating substances from the liquid endosperm of Cocus nucifera. **Advances in Coconut Research and Developed**: 219-227, 1993.

ENRIGHT, B.P.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; WARD, F.A.; YANG, X.; BOLAND, M.P.: Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs. in vivo: Implications for early embryo development and quality. **Theriogenology**. 54: 659–673, 2000.

EDWARDS, L.J.; WILLIAMS, D.A.; GARDNER, D.K.: Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH. **Human Reproduction**, 13: 344 I-3448, 1998.

EPPIG, J.J.: Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. **Reproduction, Fertility and Development**, 8: 485-489, 1996.

FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; COTTELL, D.C.; HYTTEL, P.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P.: Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. **Molecular Reproduction and Development**, 58: 186-195, 2001.

FARIAS, J.O.; NUNES, J.F.; CARVALHO, M.A.M.; SALGUEIRO, C.C.M.: Avaliação in vitro e in vivo do sêmen do Tambaqui (*Colossoma macropomum*) conservado a temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. **Revista Científica de Produção Animal**, 1: p 44-58, 1999.

FATEHI, A.N.; ROELEN, B.A.; COLENBRANDER, B.; SCHOEVERS, E.J.; GADELLA, B.M.; BEVERST, M.M.; VAN DEN HURK, R.: Presence of cumulus cells during in vitro fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. **Zygote**, 13: 177-185, 2005.

FERREIRA, M.A.L.; BRASIL, A.F.; SILVA, J.R.V.; ANDRADE, E.R.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R.: Effects of storage time and temperature on atresia of goat ovarian preantral follicles held in M199 with or without indole-3-acetic acid supplementation. **Theriogenology**, 55: 1607-1617, 2001.

FLOOD, M.R.; GAGE, T.L.; BUNCH, T.D.: Effect of various growth-promoting factors on preimplantation bovine embryo development in vitro. **Theriogenology**, 39: 823-833, 1993.

FREMOND, Y.; ZILLER R.; NUCÉ de LAMOTHE, M.: **El cocotero. Colección Agricultura Tropical**. Barcelona: Editorial Blume: 236, 1969.

FUNAHASHI, H.: Induction of capacitation and the acrosome reaction of boar spermatozoa by L-arginine and nitric oxide synthesis associated with the anion transport system. **Reproduction**, 124: 857–864, 2002.

GALLI, C.; MOOR, R.M.: Co-culture: the future for embryo development in vitro. **Acta Europaea Fertilitatis**, 20: 231-235, 1989.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I. AND LAZZARI, G.: Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, 59: 599-616, 2003.

GABLER, C.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J.: Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the estrous cycle. **Reproduction**, 126: 721-729, 2003.

GANDOLFI, F.; LUCIANO, A.M.; MODINA, S.; PONZINI, A.; POCAR, P.; ARMSTRONG, D.T.; LAURINA, A.: The in vitro developmental competence of bovine oocytes can be related to the morphology of the ovary. **Theriogenology**, 48: 1153-1160, 1997.

GAO, G.; YI, J.; ZHANG, M.; XIONG, J.; GENG, L.; MU, C.; YANG, L.: Effects of iron and copper in culture medium on bovine oocyte maturation, preimplantation embryo development, and apoptosis of blastocysts in vitro. **Journal of Reproduction and Development**, 53: 777-784, 2007.

GILARDI, S.G.T.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A.; FERREIRA, A.M.; MACHADO, M.A.; SERAPIÃO, R.V.; SOARES, A.B.M.; PINHO, T.G.; VIANA, J.H.M.: Efeito de diferentes meios de cultivo no desenvolvimento e proporção do sexo de embriões bovinos produzidos in vitro. **Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e Zootecnia**, 56: 623-627, 2004.

GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M.M.; VISINTIN, J.A.; COSTA, L.F.S.: Produção in vitro de embriões. In: Gonçalves,

P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F.: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2ª ed., São Paulo: 267, 2008.

GORDON I.: Laboratory production of cattle embryos, 2nd ed. Cambridge: CAB International, University Press; 1994.

GOOVAERTS, I.G.; LEROY, J.L.; VAN SOOM, A.; DE CLERCQ, J.B.; ANDRIES, S.; BOLS, P.E.: Effect of cumulus cell coculture and oxygen tension on the in vitro developmental competence of bovine zygotes cultured singly. **Theriogenology**, 71: 729-738, 2009.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P.; PINTADO, Z B.; DE LA FUENTE, J.: Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, 55: 1117-1126, 2001.

GUERRA, F.F.A.; NUNES, J.F.: Fertilidade in vivo e avaliação in vitro do sêmen ovino resfriado e conservado em água de coco por 72 horas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 23: 287-289, 1999.

GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S.E.I.; MÉNÉZO, Y.: Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pré-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, 7: 175-189, 2001.

GULER, A.; POULIN, N.; MERMILLOD, P.; TERQUI, M.; COGNIÉ, Y.: Effects of growth factors EGF e IGF-I e estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. **Theriogenology**, 54: 209-218, 2000.

HAFEZ, E.S.E & HAFEZ, B.. **Reprodução animal**. 7ed. Barueri: Manole: 509, 2004.

HARPER, K.M.; BRACKETT, B.G.: Bovine blastocyst development after follicle-stimulating hormone and platelet-derived growth factor treatment for oocyte maturation in vitro. **Zygote**, 1: 27-34, 1993.

HENDRIKSEN, P.J.M.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; SINGLE, I.V.P.: Using BRL cell co-culture and serum yields a lower blastocyst rate than group culture. **Theriogenology**, 51: 319, 1999.

HERRERO, M.B.; CEBRAL, E.; BOQUET, M.; VIGGIANO, J.M.; VITULLO, A; GIMENO, M.A.: Effect of nitric oxide on mouse sperm hyperactivation. **Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoan**, 44: 65-69, 1994.

HO, Y.; DOHERTY, A.S.; SCHULTZ, R.M.: Mouse preimplantation embryo development in vitro: effect of sodium concentration in culture media on RNA synthesis and accumulation and gene expression. **Molecular Reproduction Development**, 38: 131-141, 1994.

HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHMIDT, M.H.; GREVE, T.; CALLESEN, H.: High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using sofaa medium supplemented with sodium citrate and mio-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, 52: 683-700, 1999.

HOLM, P.; BOOTH, P.J.; CALLESEN, H.: Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo- and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. **Reproduction**, 123: 553–565, 2002.

HU, J.H.; JIANG, Z.L.; LV, R.K.; LI, Q.W.; ZHANG, S.S.; ZAN, L.S.; LI, Y.K.; LI, X.: The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. **Cryobiology**, 62: 83-87, 2011.

HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H.: Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, 38: 35-47, 1989.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ: **Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz. 1:** Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3ªEd., São Paulo: 44-50, 1985.

IWASAKI, S.; SHIOYA, Y.; MASUDA, H.; HANADA, A.; NAKAHARA, T.: Sex ratio of early embryos fertilized in vitro with spermatozoa separated by percoll. **Theriogenology**, **30**: 1191-1198, 1988.

IWATA, H.; AKAMATSU, S.; MINAMI, N.; YAMADA, M.: Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. **Theriogenology**, **50**: 365-375, 1998.

JACKSON, J.C.; GORDON, A.; WIZZARD, G.; McCOOK, K.; ROLLE, R.: Changes in chemical composition of coconut (Cocos nucifera) water during maturation of the fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **9**: 1049-1052, 2004.

JIMÉNEZ, A.; MADRID-BURY, N.; FERNÁNDEZ, R.; PÉREZ-GARNELO, S.; MOREIRA, P.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.: Hyperglycemia-induced apoptosis affects sex ratio of bovine and murine preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, **65**: 180-187, 2003.

JOHNSON, G.A.; BURGHARDT, R.C.; SPENCER, T.E.; NEWTON, G.R.; Ott, T.L.; Bazer, F.W.: Ovine osteopontin: II. Osteopontin and alpha(v)beta(3) integrin expression in the uterus and conceptus during the periimplantation period. **Biology of Reproduction**, **61**: 892–899, 1999.

JU, J.C.; PARKS, J.E.; YANG, X.: Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after short-term heat shock. **Molecular Reproduction and Development**, **53**: 336-340, 1999.

KEPKOVA, K.V.; VODICKA, P.; TORALOVA, T.; LOPATAROVA, M.; CECH, S.; DOLEZEL, R.; HAVLICEK, V.; BESENFELDER, U.; KUZMANY, A.; SIRARD, M.A.; LAURINCIK, J.; KANKA, J.: Transcriptomic analysis of in vivo and in vitro produced bovine embryos revealed a developmental change in cullin 1 expression during maternal-to-embryonic transition. **Theriogenology**, **75**: 1582-95, 2011.

KILLIAN, G.J.: Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. **Animal Reproduction Science**, **82-83**: 141-153, 2004.

KIM, J.H.; FUNAHASHI, H.; NIWA, K.; OKUDA, K.: Glucose requirement at different developmental stages of in vitro fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. **Theriogenology**, **39**: 875-886, 1993a.

KIM, J.H.; NIWA, K.; LIM, J.M.; OKUDA, K.: Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of in vitro-matured, in vitro-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. **Biology of Reproduction**, **48**: 1320-1325, 1993b.

KIMURA, K.; SPATE, L.D.; GREEN, M.P.; ROBERTS, R.M.: Effects of D-glucose concentration, D-fructose, and inhibitors of enzymes of the pentose phosphate pathway on the development and sex ratio of bovine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, **72**: 201-207, 2005.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H.: Effect of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, **54**: 741-758, 2000.

KOBAYASHI, K.; YAMASHITA, S.; HOSHI, H.: Influence of EGF and TGF- α on in vitro maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. **Journal of Reproduction and Fertility**, **100**: 439-446, 1994.

KRISHER, R.L. AND BAVISTER, B.D.: Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, **49**: 103-114, 1998.

KWUN, J.; CHANG, K.; LIM, J.; LEE, E.; LEE, B.; KANG, S.; HWANG, W.: Effects of exogenous hexoses on bovine in vitro fertilized and cloned embryo development: Improved blastocyst formation after glucose replacement with fructose in a serum-free culture medium. **Molecular Reproduction and Development**, 65: 167-74, 2003.

LANE, M.: Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress in vitro. **Theriogenology**, 55: 225-236, 2001.

LA ROSA, I.; CAMARGO, L.S.A.; PEREIRA, M.M.; RAFAEL FERNANDEZ-MARTIN^{1,4}, DANTE, A.PAZ.; SALAMONE, D.F.: Effects of bone morphogenic protein 4 (BMP4) and its inhibitor, Noggin, on in vitro maturation and culture of bovine preimplantation embryos. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 9: 18, 2011

LARSON, J.E., KRISHER, R.L., LAMB, G.C.: Effects of supplemental progesterone on the development, metabolism and blastocyst cell number of bovine embryos produced in vitro. **Reproduction Fertility Development**, 23: 311-318, 2011.

LAWITTS, J.A.; BIGGERS, J.D.: Joint effects of sodium chloride, glutamine, and glucose in mouse preimplantation embryo culture media. **Molecular Reproduction and Development**, 31: 189-194, 1992.

LEAL, A.C.M.S.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C.; PAES DE CARVALHO, C.S.; VIANA, K.S.; QUIRINO, C.R.: Role of nitric oxide on quality of freshly ejacuted bull spermatozoa during heparin-induced in vitro capacitation. **Animal Reproduction Science**, 116: 38-49, 2009.

LEE, E.S.; FUKUI, Y.: Effect of various growth factors in a defined culture medium on in vitro development of bovine embryos matured and fertilization in vitro. **Theriogenology**, 44: 71-83, 1995.

LEE ES, FUKUI Y.: Synergistic effect of alanine and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by vitro-produced bovine morulae and blastocysts. **Biology of Reproduction**, 55: 1383-1389, 1996.

LEE, E.S.; FUKUI, Y.; LEE, B.C.; LIM, J.M.; HWANG, W.S.: Promoting effect of amino acids added to a chemically defined medium on blastocyst formation and blastomere proliferation of bovine embryos cultured in vitro. **Animal Reproduction Science**, 84: 257-267, 2004.

LEE, H.L.; KIM, S.H.; JI, D.B.; KIM, Y.J.: A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. **Journal Veterinary Science**, 10: 249-255, 2009.

LEEuw, A.M.W.: Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. **Theriogenology**, 62: 914-925, 2006.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L.: Characterization of bovine follicular oocyte and their ability to mature in vitro. **Journal of Animal Science**, 48: 76-86, 1979.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.: Factors determining competence of in vitro produced cattle embryos. **Theriogenology**, 51: 473-485, 1999.

LEIVAS, F.G.; BRUM, MEZZALIRA, A.; PILLA, F.C.; BERNARDI, M.L.; RUBIN, M.I. B. AND SILVA, C.A.M.: Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação sem controle da atmosfera gasosa. **Ciência Rural**, 34: 219-224, 2004.

LEQUARRE, A.S.; MARCHANDISE, J.; MOREAU, B.; MASSIP. A.; DONNAY, I.: Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for in vitro produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. **Biology of Reproduction**, 69: 1707-1713, 2003.

LI, R.; WEN, L.; WANG, S.; BOU, S.: Development, freezability and amino acid consumption of bovine embryos cultured in synthetic oviductal fluid (SOF) medium

containing amino acids at oviductal or uterine-fluid concentrations. **Theriogenology**, 66: 404-414, 2006.

LIM, J.M.; KIM, J.H.; OKUDA, K.; NIWA, K.: The importance of NaCl concentration in a chemically defined medium for the development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. **Theriogenology**, 42: 421-432, 1994.

LIU, Z.; FOOTE, R.H.: Sodium chloride, osmolyte, and osmolarity effects on blastocyst formation in bovine embryos produced by in vitro fertilization (IVF) and cultured in simple serum-free media. **Journal of Assisted Reproduction Genetics**, 13: 562–568, 1996.

LONERGAN, P.; MONAGHEN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; GORDON, I.: Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, 37: 48-53, 1994a.

LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; MERMILLOD, P.: Development of bovine embryos in vitro following oocyte maturation under defined conditions. **Reproduction, Nutrition, Development**, 34: 329-339, 1994b.

LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; VAN LANGENDONCKT, A.; DONNAY, I.; KHATIR, H.; MERMILLOD, P.: Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. **Biology of Reproduction**, 54: 1420-1429, 1996.

LONERGAN, P.; O'KEARNEY-FLYNN, M. AND BOLAND, M.P.: Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. **Theriogenology**, 51: 1565-1576, 1999.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P.: Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animals**, 38: 259-267, 2003a.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; MOREIRA, P.M.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.: Temporal Divergence in the Pattern of Messenger RNA Expression in Bovine Embryos Cultured from the Zygote to Blastocyst Stage In Vitro or In Vivo. **Biology of Reproduction**, 69: 1424–1431, 2003b.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D. AND EVANS, A.C.O.: Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, 65: 137-152, 2006.

LONERGAN, P.: State-of-the-art embryo technologies in cattle. **Society Reproduction and Fertility Supplement**, 64: 315-25, 2007.

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

LORENZO, P.L.; ILLERA, M.J.; ILLERA, J.C.; ILLERA, M.: Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I. **Journal of Reproduction and Fertility**, 101: 697-701, 1994.

LUCCI, C.M.; KACINSKIS, M.A.; RUMPF, R.; BÁO, S.N.: Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. **Theriogenology**, 61: 461-472, 2004.

LUEDTKE, C.C.; MCKEE, M.D.; CYR, D.G.; GREGORY, M.; KAARTINEN, M.T.; MUI, J.; HERMO, L.: Osteopontin expression and regulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during postnatal development through to adulthood. **Biology of Reproduction**, 66: 1437-1448, 2002.

MADEIRA, V.L.H.: Criopreservação do sêmen canino com um diluidor à base de água de coco na forma de pó (ACP - 106®): efeito do tempo de equilíbrio e da taxa de descongelação. **Dissertação de mestrado**. Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará, 2007

MARLETTA, M. A.: Nitric oxide synthase structure and mechanism. **The Journal Biological Chemistry**, 268: 12231-12234, 1993.

MARTÍN-ROMERO, F.J.; MIGUEL-LASOBRAS, E.M.; DOMÍNGUEZ-ARROYO, J.A.; GONZÁLEZ-CARRERA, E.; ALVAREZ, I.S.: Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. **Reproductive Biomedicine Online**, 17: 652-261, 2008.

MARTINS, F.S.; VAN DEN HURK, R.; SANTOS, R.R.; SILVA, J.R.V.; MATOS, M.H.T.; CELESTINO, J.J.H.; RODRIGUES, A.P.R.; PESSOA, C.; FERREIRA, F.V.A.; FIGUEIREDO, J.R.: Development of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian tissue in Minimal Essential Medium supplemented with coconut water. **Animal Reproduction**, 2: 106-113, 2005.

MATSUYAMA K, MIYAKOSHI H, FUKUI Y.: Effect of glucose levels during the in vitro culture in synthetic oviduct fluid medium on in vitro development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. **Theriogenology**, 40: 595-605, 1993.

MATOS, D.G. AND FURNUS, C.C.: The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, 53: 761-771, 2000.

NEDAMBALE, T.L.; DINNYÉS, A.; GROEN, W.; DOBRINSKY, J.R.; TIAN, X.C.; YANG, X.: Comparison on in vitro fertilizqaed bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, 62: 437-449, 2004.

MEIRELLES, F.V.; CAETANO, A.R.; OWATANABE, Y.F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S.F.; MERIGHE, G.K.; GARCIA, S.M.: Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, 82-83: 13-20, 2004.

MELO, M.A.P: Água de coco em pó (acp-104) adicionada de crioprotetores sobre a morfometria da cabeça de espermatozóides de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) pós-descongelamento. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

MENDES Jr., J.O.B.; BURNS, P.D.; DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F. AND SEIDEL Jr., G.E.: Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. **Theriogenology**, 60: 331-340, 2003.

MINGOTI, G.Z.; CASTRO, V.S.D.C.; MÉO, S.C.; BARRETTO, L.S.S.; GARCIA, J.M.: The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine in vitro procedures on kinetics of oocyte maturation and embryo development. **In Vitro Cellular & Development Biology. Animal**, 47: 361–367, 2011.

MOMOZAWA, K.; FUKUDA, Y.: Establishment of an Advanced Chemically Defined Medium for Early Embryos Derived from In Vitro Matured and Fertilized Bovine Oocytes. **The Journal of Reproduction and Development**, 30: 2011.

MONACO, E.; GASPARRINI, B.; BOCCIA, L.; DE ROSA, A.; ATTANASIO, L.; ZICARELLI, L.; KILLIAN, G.: Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle. **Theriogenology**, 71: 450-457, 2009.

MONCADA, S.; HIGGS, A.: Mechanisms of disease: the l-arginine-nitric oxide pathway. **The New England Journal of Medicine**, 329: 2002-2012, 1993.

MORI, K.; DAITOH, T.; KAMADA, M.; MAEDA, N.; MAEGAWA, M.; HIRANO, K.; IRAHARA, M.; AONO, T.: Blocking of human fertilization by carbohydrates. **Human Reproduction**, 8: 1729-1732, 1993.

MOTA FILHO, A.C.: Efeito da adição de dimetilformamida ao diluente ACP-106 C sobre as características do sêmen canino congelado **Dissertação**. Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará, 2009.

NAGAO, Y.; IJIMA, R.; SAEKI, K.: Interaction between embryos and culture conditions during in vitro development of bovine early embryos. **Zygote**, 16: 127-133; 2008.

NASCIMENTO, A.B.; MARQUES, M.G.; BARROS, F.R.O.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A.; VISINTIN, J.A.: Efeito da água de coco em pó (ACP312) na maturação nuclear in vitro de oócitos suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, 35: 1197, 2007.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C.: Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, 53: 21-34, 2000.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y.: Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluidor do sêmen de mamíferos domésticos. In: **Simpósio Nacional de Biotecnologia da Reprodução de Mamíferos Domésticos**. Fortaleza, CE, 57-63, 1995.

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

NUNES, J.F.: Utilization of coconut water as diluent for caprine and ovine sêmen. **Ciência Animal**, 7: 62-69. 1997.

NUNES, J.F.: Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 22: 109-112, 1998.

NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M.: Utilização da água de coco como diluente do sêmen de caprinos e ovinos. **Revista Científica de Produção Animal**, 1: 17-46, 1999.

NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M.: Utilização da água de coco em pó (ACP) em processos biotecnológicos. In: I Congresso Brasileiro de Nutrição Animal, Fortaleza-CE. 2008. **Anais de Palestras**.

O'BRYAN, M.K.; ZINEI, A.; SCHENG, Y.; SCHLEGEL, P.: Human sperm endothelial nitric oxide syntase expression: correlation with sperm motility. **Fertility Sterility**, 70: 1143-1147, 1998.

O'DOHERTY, E.M.; WADE, M.G.; HILL, J.L.; BOLAND, M.P.: Effects of culturing bovine oocytes either singly or in groups on development to blastocysts. **Theriogenology**, 48: 161–169, 1997.

O'FLAHERTY, C.M., RODRIGUEZ, P. SRIVASTAVA, S.: L-Arginine promotes capacitation and acrosome reaction. In **cryopreserved bovine spermatozoa**. **Biochemica et Biophysica Acta**. 1674: 215-221, 2004.

OYAMADA, T.; IWAYAMA, H.; FUKUI, Y.: Additional effect of epidermal growth factor during in vitro maturation for individual bovine oocytes using a chemically defined medium. **Zygote**, 12: 143-150, 2004.

PALMA, G.A.; OLIVIER, N.; ALBERIO, R.H. AND BREM, G.: In vitro development and viability of bovine embryos produced without gassed incubator. **Theriogenology**, 49: 13, 1998.

PARK, K.W.; IGAL, K.; NIN-AL, K.: Exposure of bovine oocytes to EGF during maturation allows them to develop to blastocysts in a chemically-defined medium **Theriogenology**, 48: 1127-1135, 1997.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; WINER, W.A. & FIRST, N.L.: Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, 38: 1171-1180, 1988.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L.: Effect of bovine sperm separation by either swim up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, 44: 859-869, 1995.

PERS-KAMCZYC, E.; WARZYCHA, E.; PEIPPO, J.; LECHNIAK, D.: Growth hormone exerts no effect on the timing of the first zygotic cleavage in cattle. **Theriogenology**, 74: 581-595, 2010.

PESSOA, Pessoa N.O.: Avaliação cinética do sêmen de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) congelado em meio a base de água de coco em pó (ACP-104®) ou Ringer em três meios de ativação. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2009.

PIETERSE, M.C.; VOS, P.L.A.M.; KRUIP, TH.A.M.; WURTH, Y.A.; VAN BENEDEN, TH.H.; WILLEMSE, A.H. AND TAVERNE, M.A.M.: Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, 35: 19-24a, 1991.

PINYOPUMMINTR, T.; BAVISTER, B.D.: Effects of amino acids on development in vitro of cleavage-stage bovine embryos into blastocysts. **Reproduction, Fertility, and Development**, 8: 835-841, 1996a.

PINYOPUMMINTR T, BAVISTER BD.: Energy substrate requirements for in vitro development of early cleavage-stage bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, 44: 193-199, 1996b.

PONCE, R.H.; URCH, U.A.; YANAGIMACHI, R.: Inhibition of sperm-egg fusion in the hamster and mouse by carbohydrates. **Zygote**, 2: 253-262, 1994.

PUE, A.G.; RIVU, W.; SUNDARRAO, K.; KALUWIN, C.; SINGH, H.: Preliminary studies on changes in coconut water during maturation of fruit. **Science in new-guinea**, 18: 81-84, 1992.

PURPERA, M. N.; GIRALDO, A. M.; BALLARD, C.B.; HYLAN, D.; GODKE, R.A.; BONDIOLI, K.R. Effects of Culture Medium and Protein Supplementation on mRNA Expression of In Vitro Produced Bovine Embryos. **Molecular Reproduction and Development**, 76: 783-793, 2009.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F.: Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, 339: 62-66, 2003.

RESENDE, M.V.: Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade contínuo de PERCOLL e OptiPrep. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Universidade Estadual de São Paulo, *Campus* de Jaboticabal, 2007.

RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P.: Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. **Theriogenology**, 56: 1-16, 1991.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P.: Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction And Development**, 61: 234-248, 2002a.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; ARROYO-GARCI, R.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; GUTIE´RREZ-ADA, A: Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture

systems: implications for blastocyst quality1. **Biology of Reproduction**, 66: 589-595, 2002b.

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

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNALO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P. AND LONERGAN, P.: bovine embryo culture of zygotes in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, 68: 236-243, 2003.

RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; J DE LA FUENTE; LONERGAN, P. AND GUTIE´RREZ-ADÁN, A.: Consequences of In Vitro Culture Conditions on Embryo Development and Quality. **Reproduction in Domestic Animals**, 43: 44–50, 2008.

ROBERT, C.; MCGRAW, S.; MASSICOTTE, L.; PRAVETONI, M.; GANDOLFI, F.; SIRARD, M.A.: Quantification of housekeeping transcript levels during the development of bovine preimplantation embryos. **Biology of Reproduction**, 67: 1465–1472, 2002.

RODRIGUEZ, P.C.; O´FLAHERTY, C.M.; BECONI, M.T.; BEORLEGUI, N.B.: Nitric oxide-induced capacitation of cryopreserved bull spermatozoa and assessment of participating regulatory pathways. **Animal Reproduction Science**, 85: 231-242, 2005.

ROY, S.C.; ATREJA, S.K.: Tyrosine phosphorylation of a 38-KDa capacitation-associated buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm protein is induced by L-Arginine and Through a cAMP/PKA-independeent pathay. **Journal Andrology**, 31: 12-24, 2008.

ROSENKRANS Jr, C.F.; FIRST, N.L.: Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine. **Journal of Animal Science**, 72: 434-437, 1994.

RUBESSA, M.; BOCCIA, L.; CAMPANILE, G.; LONGOBARDI, V.; ALBARELLA, S.; TATEO, A.; ZICARELLI, L.; GASPARRINI, B.: Effect of energy source during culture on in vitro embryo development, resistance to cryopreservation and sex ratio. **Theriogenology**, 76: 1347-55, 2011

SAADELDIN, I.M.; KIM, B.; LEE, B.; JANG, G.: Effect of different culture media on the temporal gene expression in the bovine developing embryos. **Theriogenology**, 75: 995–1004, 2011.

SAGIRKAYA H, MISIRLIOGLU M, KAYA A, FIRST NL, PARRISH JJ, MEMILI E.: Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. **Animal Reproduction Science**, 101: 225-240, 2007.

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.P.L.; VIEIRA, V.L.; GONDIM, J.M., MATEOS-REX, E. Utilização de diluentes à base de água de coco “in natura” e em pó na inseminação artificial programada de cabras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 5: 96-98, 2002.

SANTOSO U.; KUBO, K.; OTA, T.; TADOKORO, T. AND MACKAWA, A.: Nutrient composition of kopyor coconuts (*Cocos nucifera* L.). **Food Chemistry**, 52: 299-304, 1996.

SHI, D.S.; LU, K.H.; GORDON, I.: Effects of bulls on fertilization on bovine oocytes and their subsequent development in vitro. **Theriogenology**, 3: 324, 1990.

SILVA, J.R.V.; CARVALHO, F.C.A.; LUCCI, C.M.; SANTOS R.R. AND FIGUEIREDO, J.R.: Conservação de folículos pré-antrais caprinos in situ em solução à base de água de coco. **Ciência Animal**, 9: 27-36, 1999.

SILVA, J.R.V.; LUCCI, C.M.; CARVALHO, F.C.A.; BÃO, S.N.; COSTA, S.H.F.; SANTOS R.R. AND FIGUEIREDO, J.R.: Effect of coconut water and Braun–Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved in situ. **Theriogenology**, 54: 809–822, 2000.

SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; COSTA, S.H.F.; ANDRADE, E.R.; NUNES, A.P.A.; FERREIRA, F.V.A.; LÔBO, R.N.B.; FIGEIREDO, J.R.: Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. **Animal Reproduction Science**, 81: 273-286, 2004.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.: Comparação entre a água de coco em pó (ACP®) e o Tris como diluidores na criopreservação do sêmen de cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 43: 767-774, 2006.

SILVA, T.F.P.; ACKERMANN, C.L.; PINHEIRO, F.T.S.; SILVA, L.D.M.: Uso da água de coco em pó (ACP-117) na criopreservação de sêmen de gato doméstico. **In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal** (Curitiba-PR). Belo Horizonte: CBRA, 2007.

SILVA, D.L.V.; ALVES, R.E.; FIGUEIREDO R.W.; MACIEL, V.T.; FARIAS, J.M.; AQUINO, A.R..L.: Physical, physical-chemical and sensorial characteristics of coconut water from green-dwarfed coconut palm from conventional and organic production. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, 33: 1079-1084, 2009

SILVA, T.V.G. Uso da L-arginina nos processos de capacitação espermática e fecundação in vitro de oócitos bovinos. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal - Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

SIRARD, M.A.: Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, 55: 1241-1254, 2001.

SREBERNICH, S. M.: Caracterização física e química da água de fruto de coco (cocos nucifera), variedade gigante e híbrido PB-121, visando o desenvolvimento de uma bebida com características próximas às da água de coco. **Tese** Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1998

STEEVES, T.E.; GARDNER, D.K.: Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. **Biology of Reproduction**, 61: 731-740, 1999.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M.: Um guia de procedimento e informação geral para o uso da tecnologia de transferência de embriões, enfatizando precauções sanitárias. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. Terceira Edição, 1999.

TAKAHASHI, Y.; FIRST, N.L.: In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. **Theriogenology**, 37: 963-978, 1992.

TAKAHASHI, Y.; KANAGAWA, H.: Effects of glutamine, glycine and taurine on the development of in vitro fertilized bovine zygotes in a chemically defined medium. **The Journal Veterinary Medical Science**, 60: 433-437, 1998.

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; DUCHATEAU, L.; DE KRUIF, A.: Inhibition of bovine sperm-oocyte fusion by the p-aminophenyl derivative of D-mannose. **Molecular Reproduction and Development**, 67: 224-232, 2004a.

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; DUCHATEAU, L.; NAUWYNCK, H.; DE KRUIF, A.: Carbohydrates and glycoproteins involved in bovine fertilization in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, 68: 492-499, 2004b.

TATEMOTO, H.; SAKURAI, N.; MUTO, N.: Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, 63: 805-810, 2000.

TAVARES, M.; CAMPOS, N. C.; NAGATO, L. A. F; LAMARDO, L. C. A.; INOMATA, E. L.; CARVALHO, M. F. H.; ARAGÃO, W. M.: Estudo da composição química da água de coco-anão verde em diferentes estágios de maturação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. **Anais CBCTA**: 16, 1998. Rio de Janeiro (CD-ROM).

TERUEL, M. & SMITH, R. Effect of embryo density and growth factors on in vitro preimplantation development of mouse embryos. **Acta Physiol Pharmacol**, 47: 87-96, 1997.

TERVIT, H.R. WHITTINGHAM, D.G. AND ROWSON, L.E.: Successful culture in vitro of the sheep and cattle ova. **Journal Reproduction and Fertility**, 30: 493-497, 1972.

THIBODEAUX, J.K.. DEL VECCHIO, R.P.; BROUSSARD J.R., DICKEY, J.F.; HANSEL, W.: Stimulation of development of in vitro-matured and in vitro-fertilized bovine embryos by platelets. **Journal Animal Science**, 71:1910-1916, 1993.

THYS, M; VANDAELE. L; MORRELL, J.M; MESTACH. J.; VAN SOOM, A.; HOOGEWIJS, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.: In vitro fertilizing capacity of frozen-thawed bull spermatozoa selected by single-layer glycidoxypropyltrimethoxysilane) silane-coated silica colloidal centrifugation. **Reproduction Domestic Animals**, 44: 390-394, 2009.

THOMPSON, J.G.: Defining the requirements for bovine embryo culture. **Theriogenology**, 45: 27-40, 1996a.

THOMPSON, J.G.; PARTRIDGE, R.J.; HOUGHTON, F.D.; COX, C. I.AND; LEESE, H.J.: Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. **Journal of Reproduction and fertility**, 106: 299-306, 1996b.

TONIOLLI, R. & MESQUITA, S.M.: Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com BTS. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 14: 249-254, 1990.

TONIOLLI, R.; BUSSIÈRE, J.; COUROT, M.; MAGISTRINI, M.; COMBAMOUS, Y.: Effect of indole-3-acetic acid (plant auxin) on the preservation at 15°C of boar semen for artificial insemination. **Reproduction Nutrition Developmental**, 36: 503-511, 1996.

UCHOA, D.C.; SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; PEREIRA, B.S.; SILVA, L.D.M.: Conservação do sêmen canino a 37°C em diluentes à base de água de coco. **Ciência Rural, Santa Maria**, 32: 91-95, 2002.

UCHOA, D.C.; SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.: Conservação do sêmen canino a 37°C em um diluidor a base de água de coco ou líquido prostático autólogo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 27: 324-325, 2003.

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

VALE, W.G.; NAHUM, B.S.; SILVA, A.O.A.; SOUSA, J.S.; SOUZA, H.E.M.; OHASHI, O.M. AND RIBEIRO, H.F.L.: Inseminação artificial em búfalos com sêmen congelado em diluente a base de água de coco (Cocos nucifera). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 23: 354-356, 1999.

VANDAELE, L.; THYS, M.; BIJTTEBIER, J.; VAN LANGENDONCK, A.; DONNAY, I.; MAES, D.; MEYER, E.; VAN SOOM, A.: Short-term exposure to hydrogen peroxide during oocyte maturation improves bovine embryo development. **Reproduction**, 139: 505–511, 2010.

VASANTHAKUMARI, R.; JAGANNATH, K.: Brief communication: rapid culture of tubercle bacilli. **Bull World Health Organ**, 76: 309-311, 1998.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.: A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, 35: 915-924, 2007.

VIREQUE, A.A.; CAMARGO, L.S.; SERAPIÃO, R.V.; ROSA E SILVA, A.A.; WATANABE, Y.F.; FERREIRA, E.M.; NAVARRO, P.A.; MARTINS, W.P.; FERRIANI, R.A.: Preimplantation development and expression of Hsp-70 and Bax genes in bovine blastocysts derived from oocytes matured in alpha-MEM supplemented with growth factors and synthetic macromolecules. **Theriogenology**, 71: 620-627, 2009.

VIVEIROS, A. T.M.; MARIA, A.N.; ORFÃO, L.H.; CARVALHO, M A. M.; NUNES, J.F.: Powder coconut water (ACP[®]) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. In: **International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (Abstracts)**. Saint Malo: France: 232, 2007.

WANG, W. L.; JIANG, H. S.; LU, K. H.; GORDON, I.; POLGE, C. The Effect of Gas Phase on the In Vitro Development of Bovine Embryos Derived from In Vitro Maturation and Fertilization of Ovarian Oocytes. **Theriogenology**, 37: 320, 1992.

WARD, F.A.; LONERGAN, P.; ENNGHT, B.P. AND BOLAND, M.P.: Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. **Theriogenology**, 54: 433-446, 2000.

WARSSAMAN, P.M.; ALBERTINI, D.F.: The mammalian ovum. In Knobil, E.; Neil, J.D.: **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven: 79-122, 1994.

WARZYCH, E.; WRENZYCKI, C.; PEIPPO, J.; LECHNIAK, D.: Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, 74: 280-289, 2007.

WATSON, A.J.; SOUSA, P.D.; CAVENEY, A.; BANCROFT, L.C.; NATALE, D.; URQUHART, J.; WESTHUSIN, M.E.: Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biology of Reproduction**, 62: 355–364, 2000.

YANAGIMACHI, R.: Mammalian fertilization. In Knobil, E.; Neil, J.D.: **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven: 189–317, 1994

YANG, X.; GILES, J.; LIU, Z.; JIANG, S.; PRESICCE, G.; FOOTE, R.; WANG, C.: In vitro fertilization and embryo development are influenced by IVF technicians and bulls. **Theriogenology**, 43: 360, 1995.

YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; PRISICCE, G.A.: Control of oocyte maturation in cows – biological factors. **Theriogenology**, 49: 471-482, 1998.

YOSHIDA, Y.; MIYAMURA, M.; HUMANO, S.; YOSHIDA, M.: Expression of growth factor ligand and their receptor mRNAs in bovine ova during in vitro maturation and after fertilization in vitro. **The Journal Veterinary Medical Science**, 60: 549-554, 1997.

YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, A.; COOPMAN, F.O.J.; MINTIENS, K.; BOERJAN, M.L.; VAN ZEVEEREN; DE KRUIF, A. AND PEELMAN, L.J.: Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos culture in vitro. **Theriogenology**, 59: 1585-1596, 2003.

ZHANG, K.; HANSEN, P.J.; EALY, A.D.: Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. **Reproduction**, 160: 815-826, 2010.

ANEXOS

MEIO 199
(SAIS DE EARLE)

SAIS INORGÂNICOS	mg/L	VITAMINAS	mg/mL
CaCl ₂ H ₂ O	265.00	Ácido ascórbico	0.050
Fe(NO ₃) ₃ 9H ₂ O	0.72	Biotina	0.010
MgSO ₄ 7H ₂ O	200.00	Calciferol	0.100
KCl	400.00	Pantotenato de Cálcio	0.010
C ₂ H ₃ O ₂ Na	50.00	Cloreto de Colina	0.500
NaCl	6800.00	Ácido fólico	0.010
NaHCO ₃	2200.00	Inositol	0.050
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	125.00	Menadione	0.010
		Ácido nicotínico	0.025
AMINOÁCIDOS	mg/L	Niacinamida	0.025
L-alanina	25.00	Ácido p-aminobenzóico	0.050
L-arginina.HCl	70.00	Piridoxal.HCl	0.025
L-ácido aspártico	30.00	Piridoxina.HCl	0.025
L-cisteína.HCl.H ₂ O	0.11	Riboflavina	0.010
L-cistina	26.00	Tiamina.HCl	0.010
L-ácido glutâmico	75.00	Acetato de Retinol	0.140
L-glutamina	100.00	Fosfato de tocoferol Na	0.01
Glicina	50.00		
L-histidina.HCl.H ₂ O	21.88	OUTROS COMPONENTES	mg/mL
Hidroxiprolina	10.00	Adenina sulfato	10.00
L-isoleucina	20.00	Adenosina trifosfato -2 Na	1.00
L-lisina.HCl	70.00	Adenosina monofosfato -Na	0.20
L-fenilalanina	25.00	Colesterol	0.20
L-leucina	60.00	Deoxiribose	0.50
L-metionina	15.00	Glicose	1000.00
L-prolina	40.00	Glutathione	0.050
L-serina	25.00	Guanina.HCL	0.30
L-treonina	30.00	Hipoxantina	0.30
L-triptofano	10.00	Vermelho de fenol	20.00
L-tirosina	57.70	Ribose	0.50
L-valina	25.00	Xantina Na	0.344
		Timina	0.30
pH=7.4		Tween80	20.00
Osmolaridade=290 mOsmol/L		Uracil	0.30

Fonte: <http://www.cultilab.com.br/paginas/cultivocelular1.8.html>

ÁGUA DE COCO (SEIS MESES)

AMINOÁCIDOS	µg/mL
Ácido Aspártico	5.4
Ácido Glutâmico	78.7
Serina	65.8
Glicina	13.9
Aspargina	10.4
Treonina	26.3
Alanina	177.1
Glutamina	13.4
Lisina	22.5
Arginina	16.8
Prolina	21.6
Valina	15.1
Leucina	31.7
Fenilalanina	10.2
Tirosina	3.1
Ácido Amonobutírico	168.8
Homoserina	5.2
Metionina, Hidroxiprolina e Histidina	Traços
ACÚCARES	mg/mL
Sacarose	8.9
Glicose	2.46
Frutose	2.51
VITAMINAS	mg/mL
Ácido nicotínico	0.64
Ácido pantotênico	0.52
Biotina	0.02
Riboflavina	0.01
Ácido fólico	0.003
Tiamina e Piridoxina	Traços
MINERAIS	mg/100mL
Potássio	312.0
Cloro	183.0
Sódio	105.0
Fósforo	37.0
Magnésio	30.0
Enxofre	24.0
Ferro	1.10
Cobre	0.04
Cálcio	Traços

Fonte: NUNES & COMBARNOUS (1994)

FLUIDO SINTÉTICO DE OVIDUTO (SOF)

SAIS INORGÂNICOS	mg/mL
NaCl	6.290
KCl	0.534
KH ₂ PO ₄	0.162
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.182
NaHCO ₃	2.100
CaCl ₂	0.262
Tricitrato de Sódio	0.100
VITAMINAS	
Mio-Inositol	0.500
AMINOÁCIDOS	
L-glutamina	0.02925
Glicina	0.376
BME (50X)	3% V/V
MEM (100X)	1% V/V
OUTROS COMPONENTES	
Piruvato	0.080
Glicose	0.180

BME 50X		BME 100X	
AMINOÁCIDOS	g/L	AMINOÁCIDOS	g/L
L-Arginina	6.32	L-Alanina	0.89
L-Cistina	1.20	L-Asparagina	1.32
L-Histidina	2.10	L-Ácido Aspártico	1.32
L-Isoleucina	2.62	L-Ácido Glutâmico	1.47
L-Leucina	2.62	L-Serina	1.05
L-Lisina	3.625	L-Prolina	1.15
L-Metionina	0.755	Glicina	0.75
L-Fenilalanina	1.65		
L-Treonina	2.38		
L-Triptofano	0.51		
L-Tirosina	1.80		
L-Valine	2.34		