

1 **ESTUDO SOBRE O CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS DURANTE O**  
2 **TRANSPORTE**

3  
4 **(*STUDIES ON IN VITRO BOVINE EMBRYOS DURING THEIR TRANSPORT*)**

5  
6 **RESUMO:** A posição de destaque ocupada pela pecuária brasileira é sustentada pela  
7 utilização e aperfeiçoamento de biotecnologias da reprodução. Pesquisas que buscam resolver  
8 problemas como a distância existente entre os laboratórios e as grandes fazendas produtoras  
9 de gado são necessárias, pois o tempo gasto no transporte interfere diretamente na qualidade  
10 embrionária e nas taxas de prenhez. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de um  
11 sistema de cultivo durante períodos longos de transporte de embriões bovinos produzidos *in*  
12 *vitro*. O experimento foi realizado no Centro de Biotecnologia da Unicesumar. Os oócitos,  
13 obtidos de ovários de vacas de abatedouro, passaram pelos procedimentos de produção de  
14 embriões *in vitro*: maturação, fertilização e cultivo embrionário e, posteriormente, foram  
15 alocados no sistema de transporte para compor os tratamentos: T1 – embriões controle  
16 mantidos na incubadora; T2 - embriões retirados do meio de cultivo no 5º dia e simulado o  
17 transporte por 48 horas; T3 - embriões retirados do meio de cultivo no 6º dia e simulado o  
18 transporte por 24 horas. Após os tratamentos, os embriões foram avaliados quanto à taxa de  
19 blastocistos no 7º dia e a taxa eclosão no 9º dia. O delineamento experimental foi inteiramente  
20 casualizado com três tratamentos e cinco repetições cada. Não foram observadas diferenças  
21 ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos. Concluiu-se que o sistema de cultivo durante o transporte, por  
22 até 48 horas, foi eficiente quanto a viabilidade embrionária; inferindo que o ambiente de  
23 transporte simulou as condições de atmosfera e de temperatura do laboratório de forma  
24 satisfatória.

25 **PALAVRAS-CHAVE:** Biotecnologia da reprodução. Blastocistos. Produção *in vitro* de  
26 embriões.

27

28 **SUMMARY:** The prominent position occupied by the Brazilian livestock is based on the use  
29 and in the improvement of reproductive biotechnologies. Research that aims to solve  
30 problems such as the distance between laboratories and the large cattle producing farms are  
31 necessary because the time spent on transport interferes directly in the embryo quality and the  
32 pregnant rates. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of a cultivation  
33 system of embryos bovine produced *in vitro*, into long periods of transportation. The  
34 experiment was accomplished in the Unicesumar Biotechnology Center. The oocytes obtained  
35 from slaughterhouse cows ovaries, passed through procedures *in vitro* production of embryos:  
36 maturation, fertilization and embryo culture and subsequently were allocated to the  
37 transportation system to compose the treatments: T1 - control embryos kept in the incubator;  
38 T2 - embryos removed from the culture medium on the 5th day and simulated transport for 48  
39 hours; T3 - embryos removed from the culture medium on the 6th day and simulated their  
40 transportation for 24 hours. After the treatments, the embryos were evaluated for blastocyst  
41 on the 7th day and hatching rate on the 9th day. The experimental design was completely  
42 randomized with three treatments and five replications. No differences were found ( $P > 0.05$ )  
43 between treatments. It was concluded that the cultivation system during transport, up to 48  
44 hours, was efficient as embryonic viability; inferring that the transportation environment  
45 simulated the conditions of atmosphere and temperature of the laboratory in a satisfactory  
46 way.

47 **Key-words:** Biotechnology reproduction. Blastocysts. *In vitro* production embryos.

48

49

## INTRODUÇÃO

50

51 A pecuária brasileira é de importância fundamental para o desenvolvimento da  
52 economia do país, pois fornece alimento para a população e gera emprego e renda (BRASIL,  
53 2013). O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo e coloca-se como  
54 segundo maior produtor e o primeiro exportador mundial de carne bovina (CONAB, 2015).

55 A posição de destaque alcançada na bovinocultura é auxiliada por pesquisas que  
56 contemplam o aperfeiçoamento de biotecnologias da reprodução. Grande parte dessas  
57 pesquisas envolvem métodos que buscam melhorar todas as etapas dos programas de  
58 produção *in vitro* de embriões (PIVE) (GONÇALVES *et al.*, 2008). Como resultado, a PIVE

59 vem obtendo avanços consideráveis nos últimos anos e está sendo amplamente incorporada a  
60 projetos de reprodução (PONTES *et al.*, 2011).

61 Para se alcançar o sucesso com a PIVE, é necessário um alto investimento em estrutura  
62 física e equipamentos, quando comparada à transferência de embriões convencional, por isso,  
63 a viabilidade econômica desta técnica é influenciada pela escala de uso e pela demanda por  
64 animais geneticamente superiores (SIQUEIRA *et al.*, 2012).

65 Dentre as pesquisas que visam os melhores resultados com o emprego da PIVE,  
66 destacam-se o estudo da função, desenvolvimento e metabolismo de gametas e embriões,  
67 utilização da ultrassonografia, desenvolvimento de fármacos seguros e efetivos,  
68 desenvolvimento de meios de cultivo (VARAGO *et al.*, 2008) e, atualmente, é reconhecido  
69 também como fator limitante para o sucesso desta técnica, a distância e o tempo decorrido no  
70 transporte dos embriões.

71 Considerando que os principais laboratórios de produção *in vitro* estão localizados nas  
72 regiões sul e sudeste do Brasil e que, as grandes fazendas produtoras de bovinos, localizam-se  
73 em novas áreas de produção, ao norte do Brasil, o tempo gasto no transporte, pode interferir  
74 diretamente na viabilidade dos embriões e nas taxas de prenhez (MARINHO *et al.*, 2012).

75 Uma escolha para o transporte dos embriões, em longas distâncias, é o transporte no  
76 próprio meio de cultivo, com controle da atmosfera gasosa, em incubadora portátil. Neste  
77 caso, os embriões são transportados em diferentes estádios de desenvolvimento, de maneira  
78 que, o fim do transporte coincida com o fim do cultivo (PONTES *et al.*, 2011).

79 Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia de um sistema de  
80 cultivo durante períodos longos de transporte de embriões bovinos produzidos *in vitro*,  
81 mediante simulação de transporte embrionário por 24 e 48 horas.

82

83

## MATERIAL E MÉTODOS

84

85 Para a realização desta pesquisa, foram utilizados ovários, obtidos de vacas mestiças,  
86 abatidas em um frigorífico na região noroeste do Paraná, no período de 07/ 05 a 09/ 07/ 2014.  
87 Os ovários foram transportados para o laboratório do Centro de Biotecnologia da Reprodução  
88 localizado na Fazenda Experimental do Centro Universitário de Maringá - Unicesumar,  
89 Maringá/PR, em garrafas térmicas, contendo solução fisiológica (0,9% NaCl), em temperatura  
90 entre 35 a 37°C.

91 No laboratório, os ovários foram lavados em álcool 70%, solução salina e mantidos em  
92 banho-maria a 37°C, sendo realizada aspiração folicular imediatamente. Os folículos com  
93 diâmetro entre 2 a 8 mm foram aspirados com o auxílio de uma agulha calibre 18 Gauge (G),  
94 acoplada a uma seringa de 10 mL. O período entre o abate e o início da aspiração não foi  
95 superior a 2 horas. Todo o material aspirado foi transferido para tubos Falcon de 50 mL. O  
96 sedimento foi transferido para placas de Petri, de poliestireno, de 60 mm de diâmetro e  
97 avaliado sob estereomicroscópio com aumento de 50x, para seleção e classificação dos  
98 oócitos.

99 Como critério de avaliação, os oócitos foram classificados de acordo com a sua  
100 morfologia (número de camadas e o grau de expansão das células do *cumulus* e o aspecto do  
101 citoplasma quanto à cor, homogeneidade e integridade) em grau I, II, III e IV, segundo  
102 Seneda *et al.* (2002). Foram selecionados para esta pesquisa, somente os complexos *cumulus*  
103 oócitos viáveis, ou seja, aqueles que apresentaram, no mínimo, três camadas de células do  
104 *cumulus* compactas e o citoplasma homogêneo (GONÇALVES *et al.*, 2008).

105 Após a seleção, os complexos *cumulus* oócitos foram maturados *in vitro* em placas  
106 contendo meio TCM199 com sais de Earles, glutamina e NaHCO<sub>3</sub>, suplementado com 10%  
107 de soro fetal bovino (SFB), 22 µg/mL piruvato, 50 µg/mL de gentamicina, 0,5 µg de

108 FSH/mL, 50 µg de LH/mL e 1 µg de estradiol/ml, mantidos em estufa a 38,5°C, em atmosfera  
109 com 5% de CO<sub>2</sub> em ar, com umidade máxima, durante 22 a 24 horas.

110 Na sequência, os oócitos foram colocados em uma placa contendo 35 gotas de 75µL de  
111 meio de maturação, com 10 oócitos por gota, cobertas por óleo mineral. A fecundação foi  
112 realizada em gotas de 75 µL de meio TALP suplementado com 10 µg/mL de heparina, 22  
113 µL/mL de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina, albumina sérica bovina-BSA (sem ácidos  
114 graxos) e solução de PHE (2 µM de penicilina, 1 µM de hipotaurina e 0,25 µM de epinefrina).  
115 O sêmen utilizado foi de um touro da raça nelore e o mesmo foi descongelado, em banho-  
116 maria a 35°C, por 30 segundos. Para seleção dos espermatozoides móveis e remoção de  
117 diluidores e do plasma seminal, foi realizada centrifugação em gradiente percoll (90 e 45%),  
118 durante 9 minutos. A concentração espermática empregada foi de 1x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL.

119 Após a fertilização, os possíveis zigotos foram cultivados *in vitro*, no meio SOF  
120 (*Synthetic Oviduct Fluid*), suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB), com monocamada de  
121 células da granulosa. O cultivo foi realizado por 24 horas após a inseminação, em incubadora,  
122 com atmosfera gasosa controlada contendo 5% CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> balanceado com N<sub>2</sub>. No dia 4  
123 (D4) realizou-se a renovação do meio de cultivo.

124 Com este procedimento, obteve-se um total de 338 estruturas (oócitos não fecundados e  
125 embriões em diferentes fases do desenvolvimento), os quais foram divididos em três  
126 tratamentos, sendo T1 (n:110) controle que permaneceu na estufa, T2 (n:118) simulação de  
127 tempo de transporte por 48 horas e T3 (n:110), simulação de tempo de transporte por 24  
128 horas.

129 Os embriões do grupo controle (T1) foram mantidos na estufa até o 7º dia de cultivo,  
130 quando se avaliou a taxa de blastocisto no dia 7 (D7) e, posteriormente, no dia 9 (D9), a taxa  
131 de blastocistos eclodidos.

132 O tratamento 2 consistiu em transferir os embriões, no 5º dia de cultivo, da incubadora  
133 para tubos de acrílico com meio CIV, sob óleo mineral, gaseificado por 30 segundos, com  
134 mistura especial gasosa contendo 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>, tampado com rolha de silicone e  
135 vedado com *Parafilm*<sup>®</sup>, simulando o transporte, por 48 horas, no transportador WTA<sup>®</sup>  
136 (Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda, Cravinhos, SP, Brasil), a 38,4°C. Ao término deste  
137 período, as estruturas foram devolvidas novamente para a placa de CIV, onde estavam sendo  
138 cultivadas na incubadora anteriormente, e procedeu-se à avaliação da taxa de blastocisto (D7).  
139 No dia 9 (D9), avaliou-se a taxa de blastocistos eclodidos.

140 O protocolo adotado para o tratamento 3, foi semelhante ao descrito para o tratamento  
141 2, porém os embriões foram transferidos no 6º dia de cultivo, e o transporte foi simulado por  
142 24 horas, no mesmo transportador já descrito, e procedeu-se à avaliação da taxa de  
143 blastocistos no D7 e a taxa de blastocistos eclodidos no D9.

144 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 3 tratamentos e cinco  
145 repetições cada. As características estudadas foram número de oócitos, taxa de blastocisto e  
146 taxa de blastocistos eclodidos. O programa estatístico utilizado para a realização das análises  
147 foi o SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 2000), utilizando-se o procedimento "Proc  
148 *Genmod*" e distribuição binomial.

149

## 150 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

151

152 Os resultados obtidos sobre o número de oócitos, número de embriões produzidos, taxa  
153 de blastocisto no D7 e taxa de blastocistos eclodidos no D9, de embriões bovinos produzidos  
154 *in vitro* e submetidos à simulação de transporte, à fresco, por 24 e 48 horas, em atmosfera  
155 gasosa controlada estão demonstrados na Tabela 1.

156

157 Com os dados obtidos, verificou-se que não houve diferenças ( $p>0,05$ ) entre as taxas de  
158 blastocistos nos tempos avaliados, evidenciando que, mesmo quando o transporte foi  
159 prolongado à produção de embriões foi satisfatória (33%). De fato, Brum *et al.* (2002)  
160 afirmaram que a média nacional da taxa de embriões produzidos é de 35% de blastocistos no  
161 7º dia de cultivo.

162 Loiola *et al.* (2014) avaliaram um programa de produção *in vitro* de embriões bovinos  
163 cuja maturação oocitária e cultivo embrionário ocorreram parcialmente durante o transporte.  
164 No 6º dia de cultivo, os embriões foram transportados, em incubadora portátil, em meio de  
165 cultivo embrionário, de São Paulo para a Bahia, um tempo médio de 18 a 24 horas. Ao fim do  
166 transporte, foram avaliadas as taxas de blastocistos e blastocistos expandidos e, na sequência,  
167 foram envasados e transferidos para as receptoras. Os autores relataram que a taxa de  
168 embriões produzidos foi de 32,85%, valores semelhantes aos encontrados neste trabalho.

169 Também em concordância com os achados desta pesquisa, Alves *et al.* (2003) avaliaram  
170 a influência do transporte de oócitos, porém com uma duração menor, 6 horas, na produção *in*  
171 *vitro* de embriões bovinos e reportaram uma taxa de embriões produzidos de 33,6%.

172 Contudo, Leivas *et al.* (2004), ao trabalharem com transporte de oócitos bovinos em  
173 meio de maturação associado a um tampão orgânico Hepes, sem controle de atmosfera gasosa  
174 e com temperatura de 39°C, verificaram uma redução significativa no desenvolvimento de  
175 embriões submetidos ao transporte por até 18 horas. Os autores relataram que os resultados  
176 negativos foram em função da incapacidade do tampão em manter o pH estável por até 18  
177 horas, fato que prejudicou o desenvolvimento dos embriões.

178 Semelhante à Loiola *et al.* (2014), acredita-se que os resultados positivos obtidos neste  
179 trabalho, sejam em função da menor variação do pH do meio, obtida com o controle da  
180 atmosfera gasosa, mantida com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e ao controle eficiente da temperatura na  
181 incubadora portátil. Estas condições se assemelharam àquelas encontradas no laboratório

182 durante a maturação *in vitro*. Pontes (2009) afirmou que a interação entre meio de cultivo e  
183 atmosfera gasosa é um item altamente estratégico para a PIVE, principalmente no que tange  
184 às condições de longos períodos de transporte.

185 Pontes (2009) avaliou um programa, em larga escala, de produção *in vitro* de embriões  
186 a partir de fêmeas leiteiras. No trabalho, os oócitos viáveis foram maturados *in vitro* por 24  
187 horas a 38,8°C e 5% CO<sub>2</sub> em ar e foi utilizado sêmen congelado sexado. Os embriões  
188 resultantes foram cultivados em condições semelhantes de temperatura e atmosfera da  
189 maturação, e tiveram seu estágio final de desenvolvimento realizado em uma estufa portátil,  
190 durante o transporte, que variou de 24 a 72 horas, para cobrir distâncias acima de 2.000 Km.  
191 O autor relatou que o esquema para o cultivo de embrião durante o transporte por longas  
192 distâncias apresentou resultados interessantes, e que a viabilidade da técnica de congelamento,  
193 associada ao transporte de embriões frescos por longas distâncias, torna possível o  
194 atendimento de demandas nacionais e internacionais.

195 Max (2011) submeteu ovelhas pluríparas da raça Santa Inês a tratamento hormonal One  
196 Shot, realizou a aspiração folicular e os oócitos selecionados foram envasados em TCM 199,  
197 gaseificados com CO<sub>2</sub> e armazenados em incubadora de transporte com ambiente controlado  
198 em 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O transporte rodoviário dos oócitos foi realizado durante 14 horas  
199 até o laboratório de PIVE, onde os oócitos completaram o período de maturação, foram  
200 fecundados, e tiveram o cultivo iniciado em meio de cultivo SOF ovine. Após 4 dias, os  
201 embriões foram submetidos ao trajeto de retorno, enviados nas mesmas condições de  
202 transporte. A autora afirmou que o One Shot foi o melhor protocolo para obtenção de oócitos  
203 e que foi possível obter prenhezes a partir da PIVE, com transportes de oócitos e embriões por  
204 até 14 horas.

205 Miranda et al. (2007) relataram que ainda são necessários estudos mais abrangentes  
206 visando o aperfeiçoamento do sistema de produção de embriões *in vitro*, com relação ao

207 cultivo, transporte e manutenção, apesar de que, atualmente, existam vários modelos de  
208 incubadoras portáteis e de fácil transporte, desenvolvidas especificamente para cultivo de  
209 oócito/embrião. De fato, o incremento de pesquisas em diferentes áreas da biotecnologia e da  
210 fisiologia promove o aumento nos índices de produção embrionária *in vitro* (SENEDA et al.  
211 2002, VARAGO *et al.* 2008).

212 Fert Vitro (2015) publicou que o transporte especializado de embriões em estufa  
213 portátil, mantendo as mesmas condições oferecidas aos embriões dentro do laboratório,  
214 retirados da incubadora no quinto ou sexto dia após a fecundação e transportados até o local  
215 onde se encontram as receptoras traz como vantagem, o fato do criador manter suas doadoras  
216 em uma área menor, próximo ao laboratório e enviar seus embriões para outras regiões  
217 maiores e mais distantes, resultando na melhora genética de seu rebanho de forma rápida e  
218 consistente.

219

220

## CONCLUSÕES

221

222 O experimento demonstrou que as condições utilizadas no transporte simularam, de  
223 forma eficiente, a produção de embriões *in vitro* no laboratório. O sistema de cultivo  
224 embrionário durante o transporte por até 48 horas é viável quali-quantitativamente inferindo  
225 que o ambiente de transporte simulou as condições de atmosfera e de temperatura do  
226 laboratório de forma satisfatória. Desta forma, acredita-se que o emprego desta biotecnologia,  
227 de forma comercial e em larga escala, viabiliza o envio de embriões para propriedades  
228 distantes dos laboratórios de produção de embriões.

229

230 **Agradecimentos**

231 À Milena Brandão Seko, bióloga, funcionária do BIOTEC/ Unicesumar, pelo apoio  
232 laboratorial, e à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosa Maria Ribeiro, pelo auxílio na redação do abstract.  
233

## REFERÊNCIAS

- 234  
235  
236 ALVES, D.F.; RAUBER, L.P.; RUBIN, F.B. et al. Desenvolvimento embrionário *in vitro* de  
237 oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes. *Brazilian Journal of*  
238 *Veterinary Research and Animal Science*. São Paulo. v.40, p. 279-286, 2003.
- 239  
240 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil. Assessoria de Gestão  
241 Estratégica (Org.). Projeções do Agronegócio, Brasil 2012/13 a 2022/23. Brasília, 2013.  
242 Disponível em  
243 <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/Projecoes%20do%](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/Projecoes%20do%20Agronegocio%20Brasil%202011-20012%20a%202021-2022%20(2)(1).pdf)  
244 [20Agronegocio%20Brasil%202011-20012%20a%202021-2022%20\(2\)\(1\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/Projecoes%20do%20Agronegocio%20Brasil%202011-20012%20a%202021-2022%20(2)(1).pdf)>. Acessado em  
245 26/03/2015.
- 246  
247 BRUM, D.S.; LEIVAS, F.G.; BERNARDI, M.L. et al. Cultivo individual de blastocistos  
248 bovinos produzidos *in vitro*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*.  
249 São Paulo, v.39, n.2, p. 87-92, 2002.
- 250  
251 CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Indicadores da Agropecuária: Quadro de  
252 Suprimentos. Disponível em < <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1538&t=2> >.  
253 Acessado em 14/03/2015.
- 254  
255 FERT VITRO –Laboratório de Fertilização *in vitro*. FertVitro realiza transporte de embriões  
256 em longas distâncias com bons resultados. Disponível em:  
257 <[http://www.fertvitro.com.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=84:fertvitro-](http://www.fertvitro.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=84:fertvitro-realiza-transporte-de-embrioes-em-longas-distancias-com-bons-resultados&catid=34:noticias&Itemid=75)  
258 [realiza-transporte-de-embrioes-em-longas-distancias-com-bons-](http://www.fertvitro.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=84:fertvitro-realiza-transporte-de-embrioes-em-longas-distancias-com-bons-resultados&catid=34:noticias&Itemid=75)  
259 [resultados&catid=34:noticias&Itemid=75](http://www.fertvitro.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=84:fertvitro-realiza-transporte-de-embrioes-em-longas-distancias-com-bons-resultados&catid=34:noticias&Itemid=75)>, acessado em 19/03/2015.
- 260  
261 GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. *Biotécnicas aplicadas à*  
262 *reprodução animal*. 2ª. ed, São Paulo, SP: Roca, 2008. 395p.
- 263  
264 LEIVAS, F.G.; BRUN, D.S.; MEZZALIRA, A. et al. Transporte de oócitos bovinos em meio  
265 de maturação sem controle de atmosfera gasosa. *Ciência Rural*, v. 24, n.1, p.219-224, 2004.
- 266

- 267 MARINHO, L. S. R.; UNTURA, R. M.; MOROTTI, F. et al. Large-scale programs for  
268 recipients of in vitro-produced embryos. *Animal Reproduction*, Campinas. v. 9, n. 3, p. 323-  
269 328, 2012.
- 270
- 271 MAX, M.C. *Produção in vitro de embriões na espécie ovina: efeito do benzoato de estradiol*  
272 *na aspiração folicular e transporte de gametas e embriões em longas distâncias*. Londrina:  
273 Universidade Estadual de Londrina, 2011. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal:  
274 Área de Concentração em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, 2006.
- 275
- 276 MIRANDA, M.S.; CARVALHO, C.M.F; CORDEIRO, M.S. et al. Sistemas alternativos de  
277 incubação e meios de cultivo para produção in vitro de embrião bovino *Revista Brasileira de*  
278 *Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.218-223, 2007.
- 279
- 280 PONTES, J.H.F. *Aspectos aplicados da produção in vitro de embriões bos indicus*. Londrina:  
281 Universidade Estadual de Londrina, 2009. 156 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal: Área  
282 de Concentração em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, 2009.
- 283
- 284 PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V. et al. Ovum pick up, in vitro  
285 embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore  
286 cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, v.75, p.1640–1646, 2011.
- 287
- 288 SAS INSTITUTE INC., *Statistical Analysis System*, Versão 8.0. Cary, NC: 2000.  
289 (Manual On-line).
- 290
- 291 SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M. et al. Aspectos técnicos e biológicos da  
292 obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura. *Semina: Ciências Agrárias*. Londrina,  
293 v.23, n.1, p.101-110, 2002.
- 294
- 295 SIQUEIRA, L. G. B.; SIQUEIRA, L. G. B.; FONSECA, J.F. et al. Factores que afectan a la  
296 fecundación in vitro em bovinos. *Spermova*, Lima, v. 01, p. 10-12, 2012.
- 297
- 298 VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção in vitro de embriões  
299 bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Revista*  
300 *Brasileira de Reprodução Animal*. Belo Horizonte. v. 2, n. 32, p.100-109, 2008.

301 **Tabela 1-** Número de oócitos, taxa de blastocistos no dia 7 (D7) e taxa de eclosão no dia 9  
 302 (D9), de embriões bovinos produzidos *in vitro* e submetidos à simulação de transporte, à  
 303 fresco, por 24 e 48 horas, em atmosfera gasosa controlada.

304

<b>Variáveis</b>	<b>Controle</b>	<b>Transporte por 24 horas</b>	<b>Transporte por 48 horas</b>
Número de oócitos (n) 338	110	118	110
Taxa de blastocisto <sup>1</sup> % (n) no D7	31a (34/110)	35a (41/118)	33a (36/110)
Taxa de eclosão <sup>2</sup> % (n) no D9	74b (25/34)	80b (33/41)	78b (28/36)

305 Letras diferentes na mesma linha diferem entre si (P&lt;0,05)

306 <sup>1</sup>Taxa de blastocisto= número de blastocistos totais/número de oócitos x 100;307 <sup>2</sup>Taxa de eclosão= números de blastocistos totais /números de blastocistos eclodidos x 100.