



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

ALZIRA REGINA SILVA DE DEUS

**INFLUÊNCIA DO SORO FETAL BOVINO EM DIFERENTES MEIOS DURANTE O
RESFRIAMENTO DE OVÁRIOS SOBRE OS PARÂMETROS QUANTI-
QUALITATIVOS DE OÓCITOS BOVINOS**

MOSSORÓ – RN

2017

ALZIRA REGINA SILVA DE DEUS

**INFLUÊNCIA DO SORO FETAL BOVINO EM DIFERENTES MEIOS DURANTE O
RESFRIAMENTO DE OVÁRIOS SOBRE OS PARÂMETROS QUANTI-
QUALITATIVOS DE OÓCITOS BOVINOS**

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira.

MOSSORÓ – RN

2017

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade da autora, sendo a mesma, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e sua respectiva autora sejam devidamente citadas e mencionadas os seus créditos bibliográficos.

D486i De Deus, Alzira Regina Silva.

INFLUÊNCIA DO SORO FETAL BOVINO EM DIFERENTES
MEIOS DURANTE O RESFRIAMENTO DE OVÁRIOS SOBRE OS
PARÂMETROS QUANTI-QUALITATIVOS DE OÓCITOS BOVINOS

/ Alzira Regina Silva De Deus. - 2017.

51 f. : il.

Orientadora: Alexsandra Fernandes Pereira.
Monografia (graduação) - Universidade Federal

Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,
2017.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCCs) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

ALZIRA REGINA SILVA DE DEUS

**INFLUÊNCIA DO SORO FETAL BOVINO EM DIFERENTES MEIOS DURANTE O
RESFRIAMENTO DE OVÁRIOS SOBRE OS PARÂMETROS QUANTI-
QUALITATIVOS DE OÓCITOS BOVINOS**

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Defendida em: 02/10/2017

BANCA EXAMINADORA

Alexsandra Fernandes Pereira

Profa. Dra. Alessandra Fernandes Pereira
Presidente/Orientadora – UFERSA

Maria Valéria de Oliveira Santos

Bacharela em Biotecnologia Maria Valéria de Oliveira Santos
Primeiro Membro – UFERSA

Luiza Bento de Queiroz Neta

Bacharela em Biotecnologia Luiza Bento de Queiroz Neta
Segundo Membro – UFERSA

Aos meus amados pais, Maria Sandra Silva de Deus e José de Deus Filho, aos meus irmãos, Rodrigo Leonel Silva de Deus e Dara Vitória Silva de Deus e minha afilhada Lis Raquel Lima de Deus por todo o amor, ajuda e compreensão, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora, que me abençoam e me dão coragem para continuar diante de todas as dificuldades.

À minha mãe, Maria Sandra Silva de Deus e ao meu pai, José de Deus Filho, por todo amor, compreensão, paciência, apoio e por estarem sempre presente, mostrando-me o caminho certo a seguir, além de não medirem esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Todas as minhas conquistas são para vocês. Muito obrigada por tudo!

Ao meu irmão, Rodrigo Leonel Silva de Deus e minha irmã, Dara Vitória Silva de Deus, pelo incentivo, apoio, amor e amizade incondicional. A minha cunhada, Léia Rodrigues Lima de Deus, pela amizade e carinho. A minha sobrinha e afilhada, Lis Raquel Lima de Deus, que me mostrou o amor mais puro e sincero, fazendo-me esquecer de todos os problemas com apenas uma ligação. Muito obrigada por seu amor.

À minha avó, Alzira da Rocha Sales, que desde pequena sempre me amou incondicionalmente e me apoiou em todas as minhas escolhas, sempre lutando para transformar meus sonhos em realidade. Obrigada por ser sempre meu maior exemplo. A você todo o meu amor e agradecimento.

A Lenira Mércia Lima Lopes e seu esposo, Aldemir Albano Lopes por me acolherem em sua casa com todo amor e carinho, por toda ajuda e por ser minha família durante toda essa caminhada. A suas filhas, Allicy Lopes, Alana Lopes e Amanda Lopes pela amizade e momentos de descontração e alegria.

Aos meus avós, tios, padrinhos, madrinhas, primos e demais familiares, por toda a paciência e incentivo ao longo desses quatro anos.

A minha orientadora, Profa. Dra. Alexsandra Fernandes Pereira, que com muita paciência e atenção, dedicou do seu valioso tempo para me orientar em cada passo deste trabalho. Obrigada pela contribuição na minha vida acadêmica e por tanta influência na minha futura vida profissional. Agradeço pela oportunidade e confiança, e por ser meu exemplo profissional.

Agradeço a toda à equipe do Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA/UFERSA), em especial a Maria Valéria de Oliveira Santos, por estarem sempre ajudando e colaborando para a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos da turma de Biotecnologia 2013.2, os quais aprendi a amar e construí laços eternos. Obrigada por estarem sempre presentes nas alegrias e tristezas durante o curso e por todos os momentos que me ajudaram a suportar a distância de casa e continuar firme nos meus objetivos. Em especial, agradeço a Regis Vinicius Fagundes Dantas e Johny Wysllas De Freitas Oliveira, por todo o companheirismo e amizade, estando sempre presente em todos os momentos dessa jornada, mostrando-se sempre fiel e rente a ajudar em qualquer dificuldade.

As minhas primas e amigas, Laís Maria das Graças Rodrigues Silva, Geovana Sarah Sales Bastista e Clareana Moura, pela amizade, incentivo e alegrias compartilhadas.

A todos os meus amigos e amigas, em especial as NS, Ana Clara da Silva Milhomem, Yasmin Lima Rodriguês, Mônica Rodrigues Lima e Laura Santos Silva, que mesmo distantes, foram sempre presentes em minha vida. Obrigada por todos os momentos de alegria.

Agradeço a Banca Examinadora pelo aceite ao convite em contribuir com a realização deste trabalho.

Ao Abatedouro Frigorífico Industrial de Mossoró S/A (AFIM) por sempre disponibilizar o material biológico para realização deste trabalho.

Aos docentes do curso de Bacharelado em Biotecnologia por toda a compreensão, suporte e ensinamentos passados.

A UFERSA pela oportunidade e suporte para realizar o sonho de me tornar Bacharela em Biotecnologia.

A todos que, mesmo não estando citados aqui, contribuíram e torceram pela conclusão desta etapa e para me tornar a pessoa que sou hoje. Muito obrigada!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

Dentre as biotécnicas voltadas à reprodução de bovinos, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) é amplamente utilizada por proporcionar inúmeras vantagens para a produtividade desses animais. Contudo, alguns fatores podem prejudicar a sua eficiência, como a qualidade dos oócitos, que muitas vezes são oriundos de ovários de abatedouros. Estes na maioria das vezes se encontram distantes dos laboratórios, levando a necessidade de estabelecimento de meios e suplementações capazes de manter as características de qualidade oocitária durante o transporte dos ovários por longos períodos. Assim, o objetivo foi avaliar a influência da presença de 10% de soro fetal bovino (SFB) em meios simples [solução salina 0,9% (NaCl) e solução tampão fosfato (PBS)] e complexos [meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) e solução tampão fosfato modificada por Dulbecco (DPBS)] durante o resfriamento de ovários por 24 h. Para tanto, cinco experimentos foram realizados comparando diferentes meios: (E1) NaCl + SFB vs. NaCl vs. não resfriado (controle); (E2) PBS + SFB vs. PBS vs. controle; (E3) DMEM + SFB vs. DMEM vs. controle; (E4) DPBS + SFB vs. DMEM vs. controle; (E5) melhores grupos dos experimentos anteriores. Para o resfriamento, ovários foram armazenados a 4–6°C por 24 h. Todos os ovários foram submetidos à aspiração folicular e os oócitos recuperados foram classificados de acordo com a morfologia em viáveis e não viáveis. Além disso, a qualidade também foi avaliada pelo ensaio de azul cresil brilhante (ACB) e os oócitos classificados em ACB⁺ (viáveis) e ACB⁻ (não viáveis). Para a avaliação da viabilidade das CCs, oócitos viáveis foram submetidos à desagregação mecânica, a suspensão celular foi corada com azul de tripano (0,2%) e células visualizadas em câmara de Neubauer. Assim, células vivas (incolor) e mortas (azul) foram contadas. Para análise estatística ($P < 0,05$) foram utilizados teste exato de Fisher e teste de chi-quadrado (viabilidade das CCs), sendo que em cada experimento foram realizadas cinco repetições. Após a realização de todos os experimentos, observou-se que o processo de resfriamento pode influenciar tanto em parâmetros quantitativos quanto qualitativos. Assim, no E1, o meio constituído apenas por NaCl permitiu melhor taxa de recuperação de oócitos em relação ao meio NaCl/SFB ($46,0\% \pm 3,4$ vs. $39,6\% \pm 4,4$), enquanto os outros parâmetros não foram diferentes entre os grupos. Já no E2, a presença de SFB em PBS influenciou positivamente a taxa de recuperação de oócitos imaturos ($41,2\% \pm 2,1$ vs. $32,8\% \pm 3,4$) e a viabilidade das CCs ($46,3\% \pm 3,3$ vs. $41,7\% \pm 1,4$), quando comparado ao grupo de ovários resfriados apenas em PBS. No E3, a presença do SFB teve uma influência negativa sobre a taxa de recuperação de oócitos imaturos ($39,9\% \pm 2,7$ vs. $40,7\% \pm 6,6$). Contudo, a adição do suplemento proteico ao DMEM se mostrou benéfica à viabilidade das CCs ($42,0\% \pm 8,2$ vs. $34,5\% \pm 8,8$). Além da taxa de recuperação, na avaliação morfológica o grupo armazenado apenas em DMEM apresentou maior taxa de oócitos viáveis em comparação ao DMEM com SFB ($73,1\% \pm 4,7$ vs. $59,0\% \pm 7,1$). Em relação ao E4, foi observada diferença entre os grupos resfriados apenas quanto à viabilidade das CCs, onde a presença de SFB em DPBS influenciou positivamente ($50,7\% \pm 5,2$ vs. $47,0\% \pm 3,9$). Já no E5, comparando os melhores grupos dos experimentos anteriores [NaCl vs. PBS + SFB vs. DMEM vs. DPBS + SFB vs. controle], a viabilidade das CCs mostrou uma maior porcentagem nos meios complexos DMEM ($54,0\% \pm 4,5$) e DPBS ($54,5\% \pm 2,8$), quando comparada aos meios simples NaCl ($48,3\% \pm 4,3$) e PBS ($50,1\% \pm 2,6$). Em conclusão, a presença do SFB em meios com alta capacidade de tamponamento (PBS e DPBS) pode se mostrar benéfica. Contudo, meios complexos, como o DMEM e o DPBS, proporcionam um ambiente mais propício para o resfriamento por 24 h de ovários bovinos.

Palavras-chave: produção *in vitro* de embriões. Suplementação proteica. Recuperação oocitária. Qualidade oocitária.

LISTA DE FIGURA

Figura 1 – Classificação morfológica de oócitos imaturos bovinos (GONÇALVES et al., 2008, com adaptações). **(A)** Grau I: oócito contendo três ou mais camadas de CCs e citoplasma homogêneo; **(B)** Grau II: oócito contendo uma ou duas camadas de CCs e citoplasma homogêneo; **(C)** Grau III: oócito parcialmente desnudo e citoplasma homogêneo ou heterogêneo; **(D)** Grau IV: oócito desnudo ou degenerado e citoplasma heterogêneo.22

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – Resultados alcançados após a redução de temperatura de transporte de ovários inteiros em mamíferos domésticos.....	25
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição dos meios de transporte de ovários bovinos.....	30
Tabela 2 – Avaliação quanti-qualitativa de oócitos imaturos bovinos derivados de ovários resfriados por 24 h em NaCl na presença e ausência de soro fetal bovino (SFB).....	33
Tabela 3 – Avaliação quanti-qualitativa de oócitos imaturos bovinos derivados de ovários resfriados por 24 h em PBS na presença e ausência de soro fetal bovino (SFB).....	34
Tabela 4 – Avaliação quanti-qualitativa de oócitos imaturos bovinos derivados de ovários resfriados por 24 h em DMEM na presença e ausência de soro fetal bovino (SFB).....	34
Tabela 5 – Avaliação quanti-qualitativa de oócitos imaturos bovinos derivados de ovários resfriados por 24 h em DPBS na presença e ausência de soro fetal bovino (SFB).....	35
Tabela 6 – Avaliação quanti-qualitativa de oócitos imaturos bovinos derivados ovários resfriados por 24 h em diferentes meios e/ou soluções.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACB	Azul cresil brilhante
CCOs	Complexos <i>cumulus</i> -oócito
CCs	Células do <i>cumulus</i>
CEUA	Comitê de Ética de Uso de Animais
CR1	Meio Charles Rosenkrans
CZB	Meio Chatot-Ziomek-Bavister
DIV	Desenvolvimento <i>in vitro</i>
DMEM	Meio essencial mínimo modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPBS	Solução tampão fosfato modificada por Dulbecco
E1	Experimento 1
E2	Experimento 2
E3	Experimento 3
E4	Experimento 4
E5	Experimento 5
et al.	E outros
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
G	Gauge
g/L	Gramas por litro
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
h	Hora
H	Hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IETS	<i>International Embryo Transfer Society</i>
KSOM	Meio de otimização simples K
LBA	Laboratório de Biotecnologia Animal
Min	Minuto
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
P	Valor de P

PBS	Solução tampão fosfato
PIVE	Produção <i>In Vitro</i> de Embriões
SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	<i>Synthetic Oviductal Fluid</i>
TALP	Tyrode-Albumina-Lactato-Piruvato
TCM199	<i>Tissue Culture Medium 199</i>
TNCS	Transferência Nuclear de Células Somáticas
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido

LISTA DE SÍMBOLOS

vs.	<i>Versus</i>
%	Percentual
n	Número
$\pm$	Mais ou menos
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1. ASPECTOS ECONÔMICOS E CIENTÍFICOS DA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES (PIVE) BOVINOS NO BRASIL.....	19
2.2. ETAPAS DA PIVE EM BOVINOS.....	20
2.3. IMPORTÂNCIA TÉCNICA DO RESFRIAMENTO OVARIANO	23
2.3.1. Fatores que afetam o resfriamento ovariano	25
2.3.2. Importância do soro fetal bovino como suplemento do meio de resfriamento	26
3. OBJETIVOS	28
3.1. OBJETIVO GERAL.....	28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. BIOÉTICA E LOCAL DE EXECUÇÃO.....	29
4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	29
4.3. COLHEITA DOS OVÁRIOS	30
4.4. RESFRIAMENTO DOS OVÁRIOS.....	30
4.5. RECUPERAÇÃO E AVALIAÇÃO DE OÓCITOS IMATUROS	31
4.5.1. Avaliação morfológica.....	31
4.5.2. Ensaio de ACB.....	31
4.5.3. Viabilidade das CCs pelo ensaio de azul de tripano.....	32
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5. RESULTADOS	33
6. DISCUSSÃO	37
REFERÊNCIAS	41
APÊNDICE A	48
APÊNDICE B.....	50

1. INTRODUÇÃO

Até a década de oitenta, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) por fecundação *in vitro* (FIV) restringia seu sucesso em apenas algumas espécies mamíferas, como leporinos (CHANG, 1959), murinos (camundongos: WHITTINGHAM, 1968 e ratos: TOYODA; CHANG, 1974) e humanos (STEPTOE; EDWARDS, 1978). Já em bovinos, apenas em 1982, ocorreu o nascimento e o desenvolvimento normal do primeiro bezerro através do procedimento de fecundação e cultivo *in vitro* de embriões, sendo os oócitos maturados obtidos ainda de técnicas *in vivo* (BRACKETT et al., 1982). Desde então, os processos envolvidos na PIVE bovina foram cada vez mais estudados e esclarecidos, até que em 1990 nasceram os primeiros bezerros normais resultantes de oócitos bovinos maturados, fecundados e cultivados totalmente *in vitro* (FUKUDA et al., 1990). A partir disso, a PIVE em bovinos tem se apresentado em um crescente desenvolvimento, o qual vem despertando também interesse de produtores brasileiros. Esse fato se deve principalmente a posição atual do rebanho nacional, que conta com aproximadamente 218,20 milhões de cabeças de gado, caracterizando o Brasil como o primeiro país que mais exporta carne bovina no mundo (IBGE, 2016; ABIEC, 2017). As características intrínsecas favoráveis do clima e dos rebanhos nacionais também são fatores que justificam o grande uso da PIVE, levando o Brasil a ocupar uma posição de liderança nesse campo (LIMA et al., 2014).

Nesse contexto, a PIVE proporciona inúmeras vantagens aos programas de reprodução animal (MACHATY et al., 2012). Dentre essas vantagens pode ser citado o melhor aproveitamento de matrizes de elevado mérito genético (MACHADO et al., 2014), o aumento do número de crias por fêmea (PALHANO, 2008), a utilização de fêmeas pré-púberes, senis ou em início de gestação (SCANAVEZ et al., 2013), o uso de animais com subfertilidade adquirida (DODE;RUMPF, 2002), além do auxílio em técnicas como a clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS), injeção intracitoplasmática de espermatozoides e transgênese (RUMPF, 2007). Além disso, através das etapas que envolvem essa biotécnica é possível estudar os fenômenos biológicos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário pré-implantacional (GONÇALVES et al., 2007).

Para a PIVE, algumas etapas são comumente realizadas, sendo elas a colheita, seleção e maturação *in vitro* (MIV) de oócitos, FIV, desenvolvimento *in vitro* (DIV), transferência embrionária e nascimento de crias viáveis (VARAGO et al., 2008). Embora essas etapas estejam esclarecidas, poucos trabalhos relatam os efeitos sofridos pelos oócitos durante o transporte dos ovários inteiros até o momento da colheita oocitária. Geralmente, os ovários

são obtidos em abatedouros e levados aos laboratórios para o processamento (SANTOS et al., 2017). Contudo, algumas vezes os locais de colheita dos ovários se encontram distantes dos laboratórios, podendo levar a um longo período de transporte até o momento da recuperação oocitária (BOHLOOLI et al., 2015). Esse tempo pode causar perdas na viabilidade e qualidade dos oócitos por se encontrar em um ambiente completamente diferente daquele encontrado *in vivo* (CELESTINO et al., 2007).

A fim de minimizar as perdas sofridas durante o tempo de transporte e armazenamento, o resfriamento ovariano em diferentes meios, suplementados ou não, pode ser utilizado (LUCCI et al., 2004). Dentre os meios, podem ser utilizados àqueles de composição mais simples, como solução tampão fosfato (PBS) e cloreto de sódio a 0,9% (NaCl), bem como meios mais complexos e nutritivos, como o meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) e solução tampão fosfato modificada por Dulbecco (DPBS) (BOHLOOLI et al., 2015). Alguns protocolos trazem ainda como suplementação desses meios a presença de fonte proteica, como o soro fetal bovino (SFB), a fim de promover o aumento da viabilidade de folículos ovarianos (FIGUEIREDO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2010). O SFB é um suplemento proteico amplamente utilizado em meios de cultivos de tecidos e células e quando presente nesses meios promove o crescimento celular *in vitro* e mantém a viabilidade das células devidos os seus componentes, tais como fatores de crescimento, hormônios, carboidratos, entre outros (PICTON et al., 2008). Assim, a sua utilização no meio de resfriamento de ovários bovinos pode fornecer um aumento da viabilidade das células foliculares e aumentar assim a viabilidade oocitária. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a suplementação de 10% de SFB em meios simples [NaCl, PBS] e complexos [DMEM e DPBS] para o resfriamento de ovários inteiros sobre os parâmetros quantitativos e qualitativos de oócitos imaturos bovinos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. ASPECTOS ECONÔMICOS E CIENTÍFICOS DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE) BOVINOS NO BRASIL

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. Atualmente, o Brasil possui o segundo maior rebanho efetivo do mundo, com mais de 200 milhões de cabeças. Além disso, de 2004 a 2014, o Brasil assumiu a liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países. Em 2016, embora o rebanho efetivo de bovinos tenha aumentado, com a marca recorde de 218,20 milhões de cabeças, houve uma diminuição do abate da espécie, o que resultou em uma queda das exportações, passando o país a ocupar a terceira posição no ranking mundial dos exportadores de carne bovina (IBGE, 2016). Devido a essa posição, o Brasil vem investindo cada vez mais em biotecnologia animal aplicada para a espécie bovina.

Dentre esses investimentos, as tecnologias de reprodução assistida têm ganhado destaque por proporcionarem novas oportunidades para produtores, particularmente na indústria de laticínios e carnes, uma vez que essas técnicas tem a capacidade de superar a infertilidade e aumentar a produtividade de animais com elevado mérito genético (RUMPF, 2007; LIMA et al., 2014). Assim, busca-se constantemente o aperfeiçoamento das biotecnologias voltadas para reprodução dessa espécie, tais como melhorias nas etapas que envolvem a inseminação artificial, a transferência de embriões e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) por fecundação *in vitro* (FIV), visando um aumento da eficiência de cada técnica (GALLI et al., 2003). Dentre essas tecnologias, a PIVE ganha destaque por ser capaz de aumentar expressivamente e com maior velocidade o número de descendentes de interesse comercial, reduzindo assim os custos de produção e gerando um maior ganho científico e econômico na produção de bovinos (CAVALIERI et al., 2015; TRINDADE et al., 2016).

No Brasil, a utilização de maneira comercial da PIVE teve início em 1998, onde se buscou conhecer os parâmetros anatômicos, fisiológicos e metabólicos das principais raças existentes no país, levado ainda na década de 90 ao estabelecimento de protocolos padrões que visaram melhorar a eficiência da PIVE e ajudaram a impulsionar a pesquisa (LIMA et al., 2014). Desde então, o Brasil obteve um imenso sucesso na utilização da PIVE para fins comerciais, destacando o país como o maior produtor mundial de embriões bovinos por FIV, usando a aspiração folicular *in vivo* (MACEDO, 2006; IETS, 2014), tornando-se referência no uso dessa biotécnica (MELLO et al., 2016). Apesar da queda do número de embriões

produzidos em 2015 com relação ao ano de 2014, o Brasil ainda tem grande potencial para aumentar a sua produção e exportação de embriões bovinos, uma vez que o tamanho e a qualidade do rebanho nacional e o aumento das melhorias nas tecnologias empregadas são correntes crescentes na agropecuária brasileira (VIANA et al., 2017). Nesse contexto, a PIVE vem se mostrando uma ótima alternativa no uso de gametas bovinos e isso pode ser notado pela grande quantidade de laboratórios particulares com domínio da técnica e os altos preços dos animais obtidos em âmbito nacional e internacional. Desse modo, as etapas da PIVE vêm sendo melhoradas a cada ano e como resultado, avanços consideráveis já foram obtidos, tornando-a a técnica mais incorporada aos sistemas de produção e reprodução (CAVALIERI et al., 2015).

De um modo geral, o desenvolvimento da PIVE só foi possível devido a anos de pesquisas em diferentes áreas da biotecnologia e da fisiologia, onde se destaca o estudo da função, desenvolvimento e metabolismo de gametas e embriões, utilização da ultrassonografia, desenvolvimento de fármacos seguros e efetivos para a manipulação hormonal e otimização de meios de cultivo eficientes e específicos (VARAGO et al., 2008; LIMA et al., 2014). Com base nesses avanços, a espécie bovina é frequentemente utilizada como modelo experimental para estudar a função ovariana e embriogênese, uma vez que o sistema reprodutivo e os embriões apresentam algumas características semelhantes aos humanos, como o padrão de metabolismo energético e o diâmetro dos embriões (ADAMS et al., 2012). Além disso, o desenvolvimento da PIVE auxilia em outras biotécnicas reprodutivas sofisticadas, como a clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS) e transgênese (GONÇALVES et al., 2007).

2.2. ETAPAS DA PIVE EM BOVINOS

A PIVE implica na realização de algumas etapas principais: colheita e seleção de oócitos imaturos, maturação oocitária *in vitro* (MIV), FIV com espermatozoides previamente selecionados e capacitados e desenvolvimento *in vitro* (DIV) dos embriões até o estágio de blastocisto quando estarão aptos para serem gestados ou criopreservados (VARAGO et al., 2008). Cada uma dessas etapas apresenta variações de acordo com o protocolo utilizado e os objetivos a serem alcançados, influenciando diretamente no resultado final.

A etapa de colheita oocitária representa grande importância para a PIVE, pois é responsável pela recuperação de estruturas em ampla quantidade e com boa qualidade para garantir um maior número de embriões viáveis ao final da técnica. Esta etapa consiste

basicamente na aspiração ou exposição do fluido folicular contendo o oócito, que se encontra no interior de folículos ovarianos (MACHATY et al., 2012). Assim, inicialmente, é importante definir a origem dos oócitos, que podem ser obtidos a partir de ovários de fêmeas *post-mortem* oriundas de abatedouro ou de fêmeas estimuladas hormonalmente. Contudo, a utilização de fêmeas de abatedouro tem grande importância pela grande disponibilidade de ovários, permitindo assim uma obtenção mais fácil e em maior quantidade de oócitos (GONÇALVES et al., 2008).

Quando se trata de ovários de abatedouro, o passo seguinte é o transporte dos ovários ao laboratório, que normalmente é realizado em solução salina (35–37°C) acrescida de antibióticos, não ultrapassando o tempo de 3 h (MORENO et al., 2015). Contudo, quando existe uma grande distância entre o abatedouro e o laboratório, resultando em um tempo de transporte maior, pode ser necessária a utilização de temperaturas mais baixas para a conservação mais adequada das estruturas (CELESTINO et al., 2007). Em todas as situações, com a chegada dos ovários ao laboratório, pode ser realizada a aspiração folicular utilizando agulha hipodérmica conectada a uma seringa ou uma bomba de vácuo ou fatiamento ovariano (*slicing*) (SOUZA-FABJAN et al., 2014). Na técnica de *slicing* é possível recuperar grandes quantidades de oócitos; contudo, a sua competência pode ser baixa, pois ocorrer à formação de muitos fragmentos teciduais que dificultam a identificação e o isolamento dos oócitos, além de ser um procedimento mais demorado. Já a aspiração folicular se mostra um método eficiente, rápido e de fácil execução que consegue resgatar uma quantidade considerável de oócitos com boa qualidade morfológica, sendo amplamente utilizada nos programas de reprodução animal (CROCOMO et al., 2012; SANTOS et al., 2016). Após o procedimento de recuperação, oócitos devem ser classificados quanto à qualidade de acordo com sua morfologia citoplasmática e número de camadas de células do *cumulus* (CCs; **Figura 1**, GONÇALVES et al., 2008). Nesse sentido, somente oócitos graus I e II têm maior qualidade e devem ser utilizados para as etapas subsequentes da PIVE, enquanto que os graus III e IV são descartados em virtude de sua baixa qualidade.

As células do *cumulus* são células somáticas que circundam o oócito e estão ligadas a ele através das junções GAP. A ligação dessas células com o oócito é de fundamental importância para seu bom funcionamento, uma vez que as substâncias produzidas por essas células tem participação importante no crescimento e maturação do oócito *in vivo* e *in vitro* (LANDIM-ALVARENGA; MAZIERO, 2014). Além disso, as CCs são de fundamental importância para a proteção estrutural, no processo de ovulação, na estimulação do transporte de aminoácidos e na biossíntese de esteroides, no processo de fecundação e no início do

desenvolvimento embrionário (BERTAGNOLLI et al., 2004; CHAGAS et al., 2014). Dessa forma, a avaliação da viabilidade das CCs se mostra um parâmetro importante na análise da qualidade oocitária, para aumentar a eficiência da PIVE no que diz respeito ao estabelecimento de meios e protocolos (GONÇALVES et al., 2008). Para tanto, tem sido utilizando o corante azul de tripano que tem a capacidade de atravessar membranas que estejam danificadas, marcando as células de azul, enquanto células vivas permanecem sem coloração (PEREIRA et al., 2010).

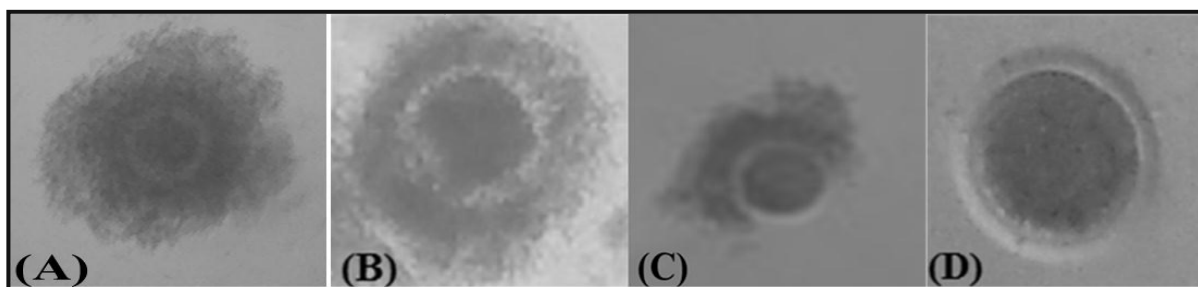


Figura 1: Classificação morfológica de oócitos imaturos bovinos (GONÇALVES et al., 2008, com adaptações). **(A)** Grau I: oócito contendo três ou mais camadas de CCs e citoplasma homogêneo; **(B)** Grau II: oócito contendo uma ou duas camadas de CCs e citoplasma homogêneo; **(C)** Grau III: oócito parcialmente desnudo e citoplasma homogêneo ou heterogêneo; **(D)** Grau IV: oócito desnudo ou degenerado e citoplasma heterogêneo. Fonte: Laboratório de Biotecnologia Animal, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

Em soma, ensaios colorimétricos podem ser empregados como métodos auxiliares na seleção oocitária. Nesse contexto, o ensaio com o corante azul cresil brilhante (ACB) pode ser utilizado para selecionar oócitos com crescimento finalizado, que apresentam um melhor desempenho nas etapas de MIV e FIV (SANTOS et al., 2016). Essa seleção é realizada através da atividade intracelular da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Essa enzima esta relacionada com o metabolismo dos oócitos e é sintetizada em grande quantidade em oócitos em fase de crescimento e em menor quantidade em oócitos crescidos. A G6PDH tem a capacidade de reduzir o ACB de azul para incolor nos oócitos em fase de crescimento, fazendo com que estes permaneçam sem coloração após a exposição por determinado tempo ao corante, enquanto que os oócitos crescidos apresentaram uma coloração azul em seu citoplasma, em virtude da baixa atividade da G6PDH (CAIXETA; DODE, 2010; SHABANKAREH et al., 2014). O tempo de exposição dos oócitos ao ACB pode variar de 60 a 90 min, contudo um tempo de 60 min é suficiente para selecionar estruturas viáveis que

podem ser utilizadas nas etapas seguintes da PIVE, não prejudicando o desenvolvimento embrionário (BORGES et al., 2014).

Finalmente, após a colheita e seleção/classificação das estruturas, os oócitos necessitam passar pelo processo de MIV para adquirir competência meiótica para a fecundação. Dessa forma, as condições de cultivo devem favorecer a nutrição e estimular o desenvolvimento oocitário, bem como fornecer uma atmosfera adequada. Segundo Mello et al. (2016), o meio mais utilizado para a MIV é o meio de cultivo tecidual – TCM 199 (*Tissue Culture Medium*) tamponado com bicarbonato de sódio e acrescido de soro fetal bovino (SFB), antibióticos, piruvato de sódio, hormônios e antioxidantes. Para manutenção da atmosfera, normalmente utiliza-se incubadora com 5% de CO₂ com temperatura de 38,5°C e umidade controlada. Para a espécie bovina, o tempo de MIV pode variar de 18 a 24 h, sendo em seguida avaliada a taxa de maturação (CHAVES et al., 2010).

Após a MIV e seleção dos oócitos maturados, os mesmos são co-incubados com espermatozoides frescos ou criopreservados previamente capacitados para a FIV em meio que favorece a fecundação mais rápida e eficiente (VARAGO et al., 2008). O meio mais utilizado para a FIV é o Tyrode-Albumina-Lactato-Piruvato (TALP) suplementado com fonte proteica. Normalmente, essa etapa é realizada por 18 a 20 h, ocorrendo nas mesmas condições atmosféricas da MIV (MACHATY et al., 2012). Posteriormente, os presumíveis zigotos são submetidos a DIV em meio fluido sintético do oviduto (SOF) até atingirem a fase de blastocisto quando poderão ser transferidos para fêmeas receptoras ou criopreservados.

2.3. IMPORTÂNCIA TÉCNICA DO RESFRIAMENTO OVARIANO

Os ovários de mamíferos são estruturas pares que tem funções endócrinas e exócrinas. A primeira função envolve a produção de estrógenos e progesterona e a outra função está relacionada com a liberação de oócitos maturados aptos para a fecundação (CHACUR et al., 2006). Morfologicamente, ovários bovinos são constituídos de duas regiões: a medular e a cortical. A região medular é localizada mais internamente, sendo altamente vascularizada, proporcionando nutrição e sustentação do ovário. Já o córtex compreende a região logo abaixo do epitélio germinativo, onde se encontram os folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento, corpos lúteos, *albicans* e hemorrágicos (FAUSTINO et al., 2011).

Para fins de pesquisa, a principal fonte de ovários para a PIVE é o abatedouro, que muitas vezes se encontram em lugares distantes dos laboratórios, sendo necessário um

armazenamento desses ovários por curtos ou longos períodos até a chegada aos laboratórios. Assim, durante o transporte, ocorre uma oclusão do fluxo sanguíneo que reduz o suprimento de oxigênio e energia para os ovários e coloca-os sob condições de isquemia e impede a reoxigenação. Essa falta de oxigênio nos tecidos resulta em uma mudança do metabolismo aeróbico para o anaeróbico, ocasionando um acúmulo de ácido lático e ácido fosfórico, diminuindo assim o pH do líquido folicular. Além disso, o impedimento da reoxigenação gera radicais livres de oxigênio que reagem com proteínas, lipídeos e DNA, resultando em inativação de enzimas, peroxidação dos lipídios da membrana e alterações genéticas (WONGSRIKEAO et al., 2005). Essas condições estimulam ainda as células a sofrer apoptose, o que leva a uma perda do material biológico ovariano, bem como a diminuição da qualidade e viabilidade dos oócitos que serão utilizados na PIVE (CAVALIERI et al., 2015).

A esse respeito, o desenvolvimento de protocolos de conservação de ovários é de fundamental importância, preferencialmente quando se trata de um sistema prático, de baixo custo, de fácil execução e que permita uma interação entre os folículos e as células do ovário, assegurando assim a viabilidade dos oócitos (BLONDIN et al., 1997; RODRIGUES et al., 2010). Nesse contexto, a técnica de resfriamento ovariano se mostra como uma ferramenta para melhorar as condições de transporte e armazenamento de ovários, visando à manutenção de suas estruturas até a manipulação *in vitro*. Essa técnica permite que as células permaneçam com uma baixa taxa metabólica durante um determinado período de armazenamento, atrasando o acúmulo dos ácidos e os processos apoptóticos, uma vez que o metabolismo e as enzimas funcionam com maior eficiência à temperatura corporal (CELESTINO et al., 2007). Portanto, a diminuição da temperatura de transporte dos ovários, evita a apoptose das células da granulosa, permite uma manutenção estável do pH do fluido folicular e diminui o número de oócitos com fragmentação no DNA, podendo essas estruturas serem resgatadas e continuar o seu desenvolvimento normal após longos períodos de armazenamento (WONGSRIKEAO et al., 2005). Um estudo avaliando o efeito do tempo e da temperatura de transporte de ovários bovinos sobre a taxa de maturação, taxa de blastocisto e desenvolvimento embrionário foi realizado e mostrou que 20°C por 24 h não afetou a taxa de maturação e nem o desenvolvimento embrionário, quando comparado a ovários não resfriados (MATSUSHITA et al., 2004). Já García-Álvarez et al. (2011) usando temperaturas ainda mais baixas (5–8°C) para resfriar ovários de veado vermelho ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) evidenciaram um maior número de embriões clivados após 48 h derivados de ovários resfriados. Outros resultados também podem ser observados quando ovários são armazenados em temperaturas abaixo da corporal (**Quadro 1**). Portanto, resfriar o ovário inteiro pode permitir uma maior

conservação da competência meiótica e, conseqüentemente, da taxa de formação de blastocistos, permitindo assim um melhor desenvolvimento embrionário quando é necessário utilizar oócitos recuperados de animais *post-mortem* que se encontram a longas distâncias dos laboratórios (TAS et al., 2006).

Quadro 1: Resultados alcançados após a redução de temperatura de transporte de ovários inteiros em mamíferos domésticos.

Espécie	Tempo	Meio	Resultados	Referência
Bovina	8 h	PBS	Taxa de clivagem: 78,5% a 24–25°C vs. 23% a 4°C vs. 8,0% a 37°C	YANG et al. (1990)
	5 h	Solução Ringer	Taxa de embriões com 8 células: 20% a 20°C vs 3% a 39°C	NAKAO; NAKATSUP et al. (1992)
	24 h	Solução salina a 0,85%	Manutenção da taxa de maturação a 10°C (67,0%)	MATSUSHITA et al. (2004)
	2–3 h	KSOM, CR1 + HEPES	Maior taxa de maturação alcançada em ovários armazenados a 4°C em comparação com ovários armazenados a 38°C e 25°C	BOHLOOLI et al. (2015)
Canina	2–4 h	NaCl a 0,9%	Taxas de maturação: 71,2% a 4°C vs. 44, 8% a 35–38°C	TAS et al. (2006)
	4°C; 8 h	NaCl a 0,9%	Taxas= de maturação a 4°C (21,1%) vs. 37°C (1,1%)	PEREIRA et al. (2015)
Equina	6 h	M199, sais Hanks e HEPES	Diminuição da temperatura para 20–30°C diminuiu a quantidade células da granulosa que sofreram apoptose	PEDERSEN et al. (2004)
	6 h	a-MEM, BSA e HEPES	Armazenamento a 4°C apresenta maior viabilidade do tecido ovariano, quando comparado ao armazenamento de fragmentos	GASTAL et al. (2017)
Felina	24 h	Solução salina	Taxa de maturação: 53,4% a 4°C vs. 20,0% a 23–25°C vs. 2,4% a 38°C	NAOI et al. (2007)
Suína	8h	Solução salina, PBS e BCS	25°C: melhor taxa de maturação em todos os três meios avaliados [PBS (72,6%); BCS (71,5%); Solução salina (65,6%)]	LIN et al. (2011)
	24 h	Solução salina 0,9%	Melhor taxa de morfologia folicular a 4°C quando comparado a 35,5°C	MOTTA et al. (2017)

2.3.1. Fatores que afetam o resfriamento ovariano

Na técnica de resfriamento de ovários, faz-se necessário que sejam conhecidos alguns fatores essenciais para manutenção das células viáveis. Esses fatores incluem a escolha do meio para o resfriamento (BOHLOOLI et al., 2015), a temperatura (PEREIRA et al., 2015) e

o tempo de transporte (MATSUSHITA et al., 2004). Com relação ao meio, podem ser utilizados àqueles de composição simples ou complexa. Os de composição simples são mais fáceis de serem adquiridos, bem como apresentam um melhor custo benefício quando comparados àqueles de composição mais complexas (SANTOS et al., 2002).

Lin et al. (2011) observaram que diferentes meios de conservação de ovários suínos apresentou efeito sobre a taxa de maturação, taxa de ativação oocitária, desenvolvimento embrionário e viabilidade das CCs, onde os meios mais nutritivos apresentaram melhores resultados. Já ovários bovinos que foram conservados em um período de 2–3 h e em diferentes temperaturas (4°C, 25°C e 38°C) e meios [solução salina normal; PBS; meio de otimização simples K (KSOM); meio Chatot-Ziomek-Bavister (CZB) e meio Charles Rosenkrans (CR1)], mostraram que a 4°C, a taxa de maturação atingiu 81% em relação às outras temperaturas de transporte. Nesse mesmo trabalho, o CR1 (80,5%) e o KSOM (80,2%) resultaram em uma melhor taxa de maturação que os demais meios, tendo um efeito significativo também na taxa de ativação oocitária. Além disso, os meios CR1 (43,6%), KSOM (43,2%) e CZB (41,1%) também apresentaram maiores taxas de embriões clivados. Esses resultados estão provavelmente relacionados à composição do meio, que apresentaram mais rico nutricionalmente, além da presença do tampão HEPES, que melhor adequou o ambiente para estas condições de temperaturas (BOHLOOLI et al., 2015).

Contudo, não existem estudos comparando o efeito de meios simples e complexos no resfriamento de ovários bovinos por longos períodos de tempo, ou seja, o armazenamento por um período acima de 20 h, bem como os efeitos que uma suplementação proteica pode causar se inserida nesse meio.

2.3.2. Importância do soro fetal bovino como suplemento do meio de resfriamento

O soro fetal bovino (SFB) é um suplemento proteico obtido do plasma sob condições assépticas e estéreis, por punção cardíaca ou venosa composto principalmente por proteínas, carboidratos, aminoácidos, fatores de crescimento, hormônios, entre outros componentes, sendo amplamente estudado e utilizado nos protocolos de experimentos com tecidos e células (PICTON et al., 2008; SAVVATEEVA et al., 2016). A concentração de soro varia de protocolo para protocolo de acordo com os resultados desejados, entretanto, a composição mais utilizada na maioria dos protocolos é a de 10% de SFB (GSTRAUNTHALER, 2003). A sua utilização em cultivo de células está comumente relacionada à capacidade de promover a proliferação celular e fornecer fatores que melhorem a viabilidade (SHELKE et al., 2014). Além disso, o SFB é uma fonte de precursores para a síntese de esteroides, como o estradiol e

a progesterona, responsáveis por promover o crescimento folicular *in vitro* quando utilizado no meio de cultivo de folículos ovarianos pré-antrais (RODRIGUES et al., 2010).

Embora não existam trabalhos que avaliem o efeito do SFB no meio de resfriamento de ovários inteiros, outros trabalhos já utilizaram suplementação proteica de diferentes origens no meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de várias espécies, como: bovinos (TELFER et al., 2000; BASSO et al., 2007), roedores (DEMEESTERE et al., 2005) e suínos (MAO et al., 2002), mostrando resultados positivos quanto a diminuição da apoptose das células foliculares, aumento do desenvolvimento, crescimento e sobrevivência dos folículos, formação de antro e aumento das taxas de recuperação de complexos *cumulus*-oócito (CCOs) intactos. Além disso, o SFB é a suplementação proteica mais utilizada nos meio de MIV, FIV e DIV de embriões (FREITAS et al., 2017). Dessa forma, é possível notar que a presença de uma suplementação no meio aumenta a viabilidade da estrutura folicular e, consequentemente, dos oócitos, o que leva a hipotetizar que a adição do SFB ao meio de resfriamento de ovários bovinos pode manter a qualidade dos folículos por um longo intervalo de tempo após a retirada do órgão do sistema *in vivo*.

A utilização de ovários inteiros apresenta vantagens em relação o armazenamento de folículos isolados ou apenas do oócitos, pois permite que as células foliculares permaneçam em contato direto com o oócito assim como ocorre *in vitro*, protegendo-o contra possíveis danos, como mudanças de temperatura e falta de suporte vascular (MATSUSHITA et al., 2004). Portanto, é importante a avaliação da presença do SFB no meio de resfriamento ovariano para a manutenção da qualidade de oócitos bovinos, bem como o meio no qual o mesmo irá proporcionar um melhor ambiente para manter essa qualidade.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação com soro fetal bovino (SFB) em meios simples e complexos durante 24 h de resfriamento ovariano sobre os parâmetros quantitativos e qualitativos de oócitos bovinos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do SFB em meios simples (NaCl e PBS) durante o resfriamento de ovários bovinos sobre a quantidade e qualidade de oócitos imaturos;
- Avaliar o efeito do SFB em meios complexos (DMEM e DPBS) durante o resfriamento de ovários bovinos sobre a quantidade e qualidade de oócitos imaturos;
- Definir o melhor meio para o resfriamento por 24 h de ovários bovinos a parti da comparação dos meios que apresentarem melhor resultado durante o resfriamento de ovários bovinos sobre a quantidade e qualidade de oócitos imaturos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. BIOÉTICA E LOCAL DE EXECUÇÃO

A presente proposta foi aprovada pelo Comitê de Ética de Uso de Animais, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (CEUA/UFERSA, no. 23091.001069/2015-79). Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA), da UFERSA.

4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

No intuito de avaliar a presença de 10% de SFB e de estabelecer qual o melhor meio (**Tabela 1**) para o resfriamento de ovários bovinos, a presente proposta foi dividida em cinco experimentos:

a) Experimento 1 (E1) : Para análise da presença de SFB em NaCl, três grupos foram comparados: **(I)** NaCl com 10% de SFB, **(II)** NaCl sem SFB e **(III)** controle não resfriado.

b) Experimento 2 (E2): Para análise da presença de SFB em PBS, três grupos foram comparados: **(I)** PBS com 10% de SFB, **(II)** PBS sem a presença de SFB e **(III)** controle não resfriado.

c) Experimento 3 (E3): Para análise da presença de SFB em DMEM, três grupos foram comparados: **(I)** DMEM com 10% de SFB, **(II)** DMEM sem a presença de SFB e **(III)** controle não resfriado.

d) Experimento 4 (E4): Para análise da presença de SFB em DPBS, três grupos foram comparados: **(I)** DPBS com 10% de SFB, **(II)** DPBS sem a presença de SFB e **(III)** controle não resfriado.

e) Experimento 5 (E5): Nesse experimento, visando avaliar qual o melhor meio, foram comparados os grupos que apresentaram melhor resultado nos experimentos anteriores.

Após todas as colheitas oocitárias, foi verificada a taxa de recuperação, bem como a qualidade dos oócitos a partir da aparência morfológica e ensaio de ACB. Adicionalmente, foi avaliada a viabilidade das CCs com o corante azul de tripiano.

Tabela 1: Composição dos meios de transporte de ovários bovinos.

Componentes (g/L)	NaCl	PBS	DMEM ¹	DPBS ²
NaCl	9,0	8,0	6,4	8,0
KCl	-	0,2	0,4	0,2
Na ₂ HPO ₄	-	1,44	0,125	1.15
KH ₂ PO ₄	-	0,24	-	0,2
NaHCO ₂	-	-	2,2	-
Aminoácidos	-	-	*	-
Vitaminas	-	-	*	-
Sais Inorgânicos	-	-	*	-
Vermelho de fenol	-	-	0,015	-
Piruvato de sódio	-	-	0,11	-
D-Glicose	-	-	1,0	-
MgCl ₂	-	-	-	0.1
CaCl ₂	-	-	-	0.133

¹Gibco® 12800-017. ² Sigma-aldrich ® D8662. *Grande quantidade de componentes.

4.3. COLHEITA DOS OVÁRIOS

Os ovários foram recuperados em abatedouro local e imediatamente transportados para o laboratório em garrafas térmicas contendo 500 mL de solução salina (NaCl, 0,9%) a 35–37°C. No laboratório, os ovários foram lavados em uma nova solução de transporte e uma avaliação macroscópica para observação da presença de folículos, de corpo lúteo e qualidade morfológica dos ovários. Em seguida, ovários foram divididos aleatoriamente de acordo com os grupos definidos no delineamento experimental.

4.4. RESFRIAMENTO DOS OVÁRIOS

Para o resfriamento, no mínimo quatro ovários por grupo foram armazenados em tubos de 50 mL contendo aproximadamente 25 mL da solução de resfriamento definida no delineamento experimental. Após o armazenamento, os tubos foram levados e mantidos em um refrigerador com termômetro para verificação da temperatura (4–6°C) por 24 h. Ovários derivados dos grupos controle (não resfriados) foram processados imediatamente após a colheita.

4.5. RECUPERAÇÃO E AVALIAÇÃO DE OÓCITOS IMATUROS

Para a recuperação oocitária, cada grupo de ovários foi submetido à aspiração folicular (fóliculos de 2–8 mm) utilizado agulha 21G e seringa de 5,0 mL e o líquido aspirado foi depositado separadamente em tubos de 50 mL cobertos com papel alumínio. Os tubos contendo líquido folicular foram mantidos em banho-maria (37°C) por 15 min para sedimentação das estruturas.

Após esse tempo, o conteúdo sedimentado foi colocado em placas quadriculadas (100 x 20 mm) contendo aproximadamente 2,0 mL de PBS onde foi realizada a procura e a avaliação dos oócitos sob estereomicroscópio.

4.5.1. Avaliação morfológica

Para a avaliação morfológica, oócitos recuperados foram classificados de acordo com o número de camadas de CCs e homogeneidade do citoplasma (**Figura 1**), onde aqueles que apresentaram três ou mais camadas de CCs e citoplasma homogêneo foram considerados viáveis de grau I; os que apresentaram uma ou duas camadas de CCs e citoplasma homogêneo foram considerados viáveis de grau II; oócitos parcialmente desnudos com citoplasma homogêneo ou heterogêneo foram considerados não viáveis de grau III e oócitos desnudos ou degenerados com citoplasma heterogêneo foram considerados não viáveis de grau IV (GONÇALVES et al., 2008, com adaptações).

4.5.2. Ensaio de ACB

Para o ensaio de ACB, os oócitos foram lavados duas vezes em gotas de 200 µL de PBS e incubados em gotas de 300 µL de 26 µM de ACB por 60 min em temperatura controlada (38,5°C) (BORGES et al., 2014). Decorrido o tempo, as estruturas foram avaliadas sob estereomicroscópio e àquelas que apresentaram citoplasma azul foram classificadas em

positivas (ACB⁺, viáveis), enquanto as que não apresentaram coloração no citoplasma foram consideradas negativas (ACB⁻, não viáveis) (OPIELA et al., 2008).

4.5.3. Viabilidade das CCs pelo ensaio de azul de tripano

Os oócitos selecionados morfologicamente como viáveis foram alocados aleatoriamente em gotas de 100 µL de PBS para desagregação mecânica das CCs por sucessivas pipetagens, resultando em uma suspensão celular. Posteriormente, 95 µL da suspensão celular foram submetidas à coloração com 5,0 µL do corante azul de tripano (0,2%) para avaliação da viabilidade em câmara de Neubauer, onde as células presentes nos quatro quadrantes externos foram contabilizadas. Assim, as células que apresentaram coloração azul foram consideradas mortas e as células sem coloração foram consideradas vivas (SANTOS et al., 2006).

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em médias percentuais $\pm$ erro padrão e os seguintes parâmetros foram avaliados: taxa de recuperação oocitária (relação entre o número de oócitos recuperados e o número de folículos aspirados x 100), percentual de oócitos viáveis pela morfologia (número de oócitos viáveis/número de estruturas recuperadas x 100), ensaio de ACB (número de oócitos viáveis/número de estruturas recuperadas x 100) e viabilidade das CCs (número de células vivas/total de células contadas x 100).

Todos os grupos foram comparados entre si, usando o software Graphpad InStat 3.06 (GraphPad Software Inc., La Jolla, EUA). O teste exato de Fisher foi usado para todas as análises, exceto os dados de viabilidade das CCs. Para o parâmetro de viabilidade das CCs por azul de tripano foi utilizado o teste do chi-quadrado. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Finalmente, cinco repetições por experimento foram consideradas para a análise de dados, totalizando 25 repetições viáveis para as análises.

5. RESULTADOS

A fim de avaliar os parâmetros quantitativos e qualitativos de oócitos bovinos resfriados por 24 h em meios simples (NaCl e PBS) e complexos (DMEM e DPBS) suplementado ou não com SFB.

Inicialmente, para o E1, avaliou-se o efeito do resfriamento em NaCl na presença e ausência de SFB. Para tanto, um total de 121 ovários foi distribuído em três grupos: 41 ovários não resfriados (controle), 40 ovários resfriados por 24 h em NaCl/SFB e 40 ovários resfriados em NaCl. Após cinco repetições, observou-se que a quantidade de oócitos recuperados foi afetada quando na presença do SFB no meio de resfriamento, onde este teve uma influência negativa na taxa de recuperação de oócitos imaturos viáveis e não viáveis, em que uma maior taxa foi evidenciada no grupo de ovários resfriados apenas com NaCl (**Tabela 2**). Contudo, o resfriamento não afetou a qualidade oocitária e a viabilidade das CCs em nenhum dos grupos avaliados, independente do meio de armazenamento. Desta forma, o grupo NaCl na ausência de SFB, que não apresentou resultado negativo em nenhum parâmetro, foi usado no quinto experimento.

Tabela 2: Avaliação quanti-qualitativa de oócitos imaturos bovinos derivados de ovários resfriados por 24 h em NaCl na presença e ausência de soro fetal bovino (SFB)

Grupos	Taxa de recuperação (n)	Qualidade oocitária		Viabilidade das CCs
		Avaliação morfológica (n)	Ensaio de ACB (n)	
Não resfriado	43,8 ± 3,6 (192/438) ^{ab}	53,6 ± 3,4 (103/192) ^a	42,4 ± 5,1 (64/151) ^a	51,3 ± 2,4 (2037/3974) ^a
NaCl/SFB	39,6 ± 4,4 (242/611) ^b	66,9 ± 2,4 (162/242) ^a	39,6 ± 4,1 (76/192) ^a	49,6 ± 0,5 (2824/5691) ^a
NaCl	46,0 ± 3,4 (287/624) ^a	67,2 ± 5,2 (193/287) ^a	38,2 ± 4,8 (92/241) ^a	50,3 ± 2,4 (2125/4221) ^a

Média ± erro padrão. ^{a,b}: diferem na mesma coluna (P < 0,05)

Com relação ao E2, um total de 108 ovários foi distribuído em três grupos: não resfriados (37), resfriados em PBS/SFB (36) e PBS (35). Inicialmente, o resfriamento afetou os parâmetros oocitários quanto à taxa de recuperação de oócitos imaturos bovinos e viabilidade das CCs dos oócitos recuperados (**Tabela 3**). Além disso, a presença de SFB influenciou positivamente tanto na avaliação quantitativa (taxa de recuperação) quanto na viabilidade das CCs dos oócitos imaturos, quando comparados ao grupo de ovários resfriados

apenas em PBS. Já a qualidade por morfologia e ensaio de ACB foi semelhante em todos os grupos. Portanto, o grupo PBS na presença de SFB foi escolhido para o quinto experimento.

Tabela 3: Avaliação quanti-qualitativa de oócitos imaturos bovinos derivados de ovários resfriados por 24 h em PBS na presença e ausência de soro fetal bovino (SFB).

Grupos	Taxa de recuperação (n)	Qualidade oocitária		Viabilidade das CCs
		Avaliação morfológica (n)	Ensaio de ACB (n)	
Não resfriado	42,0 ± 5,0 (231/550) ^a	67,5 ± 4,8 (156/231) ^a	40,3 ± 8,1 (73/181) ^a	49,0 ± 2,8 (1564/3193) ^a
PBS com SFB	41,2 ± 2,1 (217/527) ^a	68,7 ± 4,9 (149/217) ^a	44,4 ± 4,6 (72/162) ^a	46,3 ± 3,3 (2445/5286) ^b
PBS	32,8 ± 3,4 (155/473) ^b	60,0 ± 6,2 (93/155) ^a	42,6 ± 3,7 (49/115) ^a	41,7 ± 1,4 (1356/3252) ^c

Média ± erro padrão. ^{a,b,c}: diferem na mesma coluna (P < 0,05)

Já no E3, de 71 ovários recuperados, 38 foram processados imediatamente (controle), 36 e 35 foram resfriados em DMEM/SFB e DMEM, respectivamente. A princípio o resfriamento afetou a taxa de recuperação, a qualidade oocitária quanto à morfologia e a viabilidade das CCs. Com relação à presença do SFB, apenas a viabilidade das CCs apresentou resultados positivos comparando ao DMEM sem a presença do suplemento proteico, sendo a taxa de recuperação e avaliação morfológica por método convencional influenciada negativamente pela presença do SFB (**Tabela 4**). O ensaio de ACB foi semelhante entre os grupos avaliados (P > 0,05). Assim, o grupo DMEM apresentou-se melhor em dois parâmetros e, portanto, foi selecionado para o quinto experimento.

Tabela 4: Avaliação quanti-qualitativa de oócitos imaturos bovinos derivados de ovários resfriados por 24 h em DMEM na presença e ausência de soro fetal bovino (SFB).

Grupos	Taxa de recuperação (n)	Qualidade oocitária		Viabilidade das CCs
		Avaliação morfológica (n)	Ensaio de ACB (n)	
Não resfriado	33,0 ± 5,0 (227/687) ^a	60,4 ± 8,9 (137/227) ^a	36,6 ± 9,6 (64/175) ^a	51,7 ± 3,2 (1392/2691) ^a
DMEM com SFB	22,5 ± 1,7 (161/714) ^b	59,0 ± 7,1 (95/161) ^a	33,9 ± 8,4 (42/124) ^a	42,0 ± 8,2 (1256/2987) ^b
DMEM	30,1 ± 4,3 (193/642) ^a	73,1 ± 4,7 (141/193) ^b	29,0 ± 12,9 (42/145) ^a	34,5 ± 8,8 (1844/5349) ^c

Média ± erro padrão. ^{a,b,c}: diferem na mesma coluna (P < 0,05)

No E4, um total de 98 ovários foi distribuído entre os grupos: não resfriados (32) e resfriados em DPBS/SFB (33) e DPBS (33). Inicialmente, o resfriamento afetou à taxa de recuperação de oócitos imaturos bovinos (**Tabela 5**). DPBS/SFB e DPBS foram semelhantes quanto à taxa de recuperação e qualidade avaliada por morfologia e ensaio de ACB. Contudo, a presença do SFB influenciou positivamente a viabilidade das CCs, sendo superior ao grupo de ovários resfriados apenas em DPBS. Portanto, o grupo DPBS/SFB foi selecionado para o quinto experimento.

Tabela 5: Avaliação quanti-qualitativa de oócitos imaturos bovinos derivados de ovários resfriados por 24 h em DPBS na presença e ausência de soro fetal bovino (SFB)

Grupo	Taxa de recuperação (n)	Qualidade oocitária		Viabilidade das células do cumulus
		Avaliação morfológica (n)	Ensaio de ACB (n)	
Não resfriado	53,2 ± 6,5 (291/547) ^a	60,5 ± 4,9 (176/291) ^a	44,7 ± 3,5 (105/235) ^a	50,8 ± 0,9 (2108/4146) ^a
DPBS/SFB	39,9 ± 2,7 (162/406) ^b	63,0 ± 6,4 (102/162) ^a	37,2 ± 4,0 (45/121) ^a	50,7 ± 5,2 (1716/3386) ^a
DPBS	40,7 ± 6,6 (199/489) ^b	56,8 ± 8,6 (113/199) ^a	41,4 ± 4,4 (70/169) ^a	47,0 ± 3,9 (1191/2533) ^b

Média ± erro padrão. ^{a,b}: diferem na mesma coluna (P < 0,05)

Para o E5, os grupos que obtiveram melhores resultados nos experimentos anteriores (NaCl, PBS/SFB, DMEM, DPBS/SFB) e grupo controle foram comparados entre si. Para tanto, um total de 134 ovários foram distribuídos entre os grupos: NaCl (24), PBS/SFB (27), DMEM (28), DPBS/SFB (28) e não resfriado (27).

Todos os meios foram semelhantes em relação à taxa de recuperação, morfologia e ensaio de ACB (P > 0,05). Contudo, o resfriamento afetou a viabilidade das CCs, onde os grupos de meios complexos (DMEM e DPBS/SFB) mostraram viabilidade superior aos grupos de meios simples (NaCl e PBS/SFB) (**Tabela 6**). Além disso, os dois grupos com meios complexos mostraram uma maior proximidade com o grupo controle em relação a esse parâmetro.

Tabela 6: Avaliação quanti-qualitativa de oócitos imaturos bovinos derivados ovários resfriados por 24 h em diferentes meios e/ou soluções.

Grupo	Taxa de recuperação (n)	Qualidade oocitária		Viabilidade das CCs
		Avaliação morfológica (n)	Ensaio de ACB (n)	
Não resfriado	39,8 ± 6,8 (192/482) ^a	60,4 ± 4,8 (116/192) ^a	42,6 ± 88 (60/141) ^a	62,7 ± 3,1 (2265/3612) ^a
NaCl	46,5 ± 8,3 (140/301) ^a	74,3 ± 6,8 (104/140) ^a	44,3 ± 12,4 (47/106) ^a	48,3 ± 4,3 (1288/2665) ^c
PBS/SFB	53,4 ± 4,4 (163/305) ^a	66,3 ± 5,9 (108/163) ^a	47,5 ± 6,4 (58/122) ^a	50,1 ± 2,6 (1349/2690) ^c
DMEM	42,5 ± 3,9 (145/341) ^a	65,5 ± 4,3 (95/145) ^a	40,4 ± 4,1 (42/104) ^a	54,0 ± 4,5 (1674/3100) ^b
DPBS/SFB	36,5 ± 7,0 (157/430) ^a	67,5 ± 4,6 (106/157) ^a	42,3 ± 2,4 (47/111) ^a	54,5 ± 2,8 (2199/4031) ^b

Média ± erro padrão. ^{a,b}: diferem na mesma coluna (P < 0,05)

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi avaliado o efeito do SFB em quatro diferentes meios (NaCl, PBS, DMEM e DPBS), no intuito de definir qual proporcionaria o melhor ambiente para o resfriamento de ovários bovinos por 24 h. Os cinco experimentos evidenciaram que o resfriamento pode afetar, principalmente, a taxa de recuperação de oócitos imaturos e a viabilidade das CCs. Com relação à taxa de recuperação, o longo período de armazenamento dos ovários pode tornar menos firme a ligação dos oócitos na parede do folículo, facilitando a perda dos mesmos na hora da aspiração (GUIGNOT et al., 1999). Já a viabilidade das CCs pode ser afetada tanto pela temperatura, quanto pelo ambiente em que se encontram, onde já foi mostrado que as CCs em contato direto com as células foliculares têm uma maior capacidade de se manter viável (SIRARD; COENEN, 1993). Contudo, a presença do SFB não se mostrou benéfica quando adicionado em NaCl e DMEM, de acordo com alguns parâmetros avaliados. Além disso, em PBS e DPBS, a presença do SFB mostrou-se favorável para a manutenção mais adequada dos oócitos de ovários resfriados por 24 h.

O NaCl é um meio simples, de fácil preparo e baixo custo, razões essas que fazem seu uso ser muito frequente para o transporte de ovários. Contudo, não é um meio rico em nutrientes, o que pode ser prejudicial para uso por longos períodos de tempo, como foi mostrado em um trabalho realizado por Wongsrikeao et al. (2005) que armazenaram ovários suínos em diferentes temperaturas e tempos, observando que o período de armazenamento superior a 6 h podem acidificar o líquido folicular e levá-lo a uma ruptura, bem como a uma fragmentação do DNA dos oócitos recuperados. Por outro lado, os experimentos realizados no presente trabalho mostraram que o resfriamento de ovários bovinos por 24 h em NaCl não influenciou os parâmetros qualitativos dos oócitos. Além disso, a presença do SFB no NaCl, mesmo não mostrando diferenças nos resultados de qualidade oocitária, mostrou-se inferior a recuperação dos oócitos através da aspiração folicular. Contudo, esse resultado não indica que o SFB não tenha uma ação positiva no resfriamento de ovários em NaCl, mas sim que esses efeitos somente possam ser visualizados em análises mais específicas dos oócitos, como por exemplo na taxa de maturação ou desenvolvimento embrionário.

Já o PBS/SFB apresentou melhor resultado tanto na taxa de recuperação de oócitos imaturos, quanto na viabilidade das CCs. Este meio apresenta em sua composição uma maior quantidade de componentes, quando comparado ao NaCl, sendo complementado ainda pelos componentes do SFB. Os bons resultados obtidos com PBS/SFB podem ser explicados

também devido à presença de substratos energéticos do SFB, que combinados com os nutrientes presentes no PBS, forneceram maior aporte nutricional para sustentar a viabilidade folicular por longos períodos de armazenamento (SANTOS et al., 2002). Além disso, o PBS/SFB pode ter permitido que uma maior quantidade de CCs permanecesse viva após as 24 h de resfriamento, promovendo uma melhor manutenção da integridade da membrana (LIN et al., 2011).

No que diz respeito ao experimento com DMEM, o presente estudo mostrou que a presença do SFB influenciou negativamente a taxa de recuperação e não foi capaz de melhorar a morfologia dos oócitos comparado ao meio só com DMEM. Esse resultado mostrou-se diferente de estudos anteriores, como o realizado por Bohlooli et al. (2015) que compararam o efeito do resfriamento de ovários bovinos em meios simples e semi-complexos, mostrando uma taxa de maturação e de clivagem superior em ovários armazenados em meios semi-complexos, ou seja, meios mais nutritivos. Lin et al. (2011) também observaram que a taxa de maturação de oócitos suínos derivados de ovários armazenados, foram maiores quando a solução de armazenamento apresentava uma composição mais rica [PBS (72,6%) vs Solução Braun-Collins (71,5%) vs solução salina (65,6%)]. Em contrapartida, a presença do SFB se mostrou benéfica para a viabilidade das CCs, o que pode ser explicado pela presença de fatores de crescimento, aminoácidos, vitaminas e outros nutrientes presentes tanto no soro quanto no DMEM, que combinados permitem um ambiente favorável para a manutenção das células que circundam os oócitos.

O presente estudo também comparou o efeito do SFB em meio complexo de alta capacidade tamponante, o DPBS. Inicialmente, o resfriamento teve efeito negativo sobre a taxa de recuperação dos dois grupos resfriados por 24 h, resultado que pode ser influenciado tanto pela manipulação na hora da aspiração, quanto por uma degeneração dos folículos causada pela baixa temperatura, facilitando assim a perda dos oócitos na hora da recuperação oocitária (KIM et al., 2006). Contudo, a viabilidade das CCs no grupo suplementado com SFB foi semelhante ao controle, o que leva a afirmar que um meio mais rico em nutrientes e com alta capacidade de tamponamento pode garantir uma maior viabilidade dos CCOs, uma vez que as CCs têm como função principal a proteção e nutrição dos mesmos (LIN et al., 2011; BOHLOOLI et al., 2015).

Finalmente, este é o primeiro estudo a avaliar os efeitos de uma suplementação proteica em meios simples e complexos no resfriamento de ovários bovinos por longo período de tempo (24 h). Nesse contexto, para estabelecer também o melhor meio de armazenamento, suplementado ou não, os melhores resultados obtidos de cada experimento foram comparados

entre si ao longo de cinco repetições, no intuito de definir àquele que proporciona uma melhor qualidade dos oócitos e que poderia ser posteriormente utilizado nos programas de reprodução animal.

Trabalhos anteriores com conservação de folículos ovarianos caprinos, já relataram que meios simples e complexos não diferem quanto à taxa de degeneração folicular após conservação a 4°C (SILVA et al., 2003; SANTOS et al., 2002). Estes trabalhos estão de acordo com os resultados encontrados nos nossos experimentos, comparando os quatro melhores resultados obtidos anteriormente, onde não foi observada diferença na taxa de recuperação oocitária, na morfologia dos oócitos recuperados e ensaio de ACB, levando a afirmar que as características dos folículos permaneceram após 24 h de resfriamento. Contudo, os meios complexos, suplementados ou não com SFB, que foram testados nesse estudo e apresentaram uma maior quantidade de nutrientes em sua composição, tiveram maior capacidade de manter a viabilidade das CCs, mostrando que esse fator é de grande importância para a conservação de ovários resfriados por longos períodos de tempo.

Além disso, a presença do SFB em meio com alta capacidade de tamponamento permite um ambiente mais adequado para manutenção das características de qualidade dos ovários e, conseqüentemente, dos oócitos, uma vez que longos períodos de armazenamento fora do ambiente *in vivo* acidificam o líquido folicular devido a mudanças no metabolismo. Essa acidificação ocorre devido a um acúmulo de H nas células do ovário, sendo então liberadas no líquido folicular. Dessa forma, a presença de grande quantidade de H no ambiente que circunda o oócito leva a passagem desses íons para o interior do oócitos, provocando uma degeneração do DNA e, conseqüentemente, uma perda de sua viabilidade (WONGSRIKEAO et al., 2005). Assim, meios que têm a capacidade de manter o pH estável, oferecem um melhor ambiente para o armazenamento de ovários, permitindo assim que as suas células utilizem melhor o oxigênio e glicose presente do meio, bem como mantem as enzimas e hormônios em faixas fisiológicas, garantindo suas funções e viabilidade mesmo em condições de isquemia por períodos longos de tempo (SALEHI et al., 2004).

Contudo, a presença de fontes energéticas e tampões na composição do DMEM e do DPBS/SFB podem ter contribuído para esse resultado positivo (BOHLOOLI et al., 2015). Portanto, estes meios contribuem para que a falta de suporte vascular não acarrete em mudanças drásticas de metabolismo e, conseqüentemente, aumente o acúmulo de metabólitos prejudiciais no espaço intrafolicular (MAO et al., 2002; PEREIRA et al., 2015). Contudo, em situações de necessidade, meios simples podem ser usados, pois apesar de menos eficientes conseguem conservar a qualidade oocitária e a taxa de recuperação.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados encontrados pode-se confirmar que o resfriamento a 4°C e o meio de conservação de ovários bovinos por 24 h podem influenciar em fatores de qualidade de oócitos bovinos. A presença do SFB em meios com alta capacidade de tamponamento (PBS e DPBS) mostra benéfica para a viabilidade das CCs e taxa de recuperação oocitária. Contudo, o uso de uma suplementação proteica em um meio muito nutritivo ou muito simples não se mostrou importante para manter a qualidade dos oócitos.

Dessa forma, pode-se afirmar que meios complexos como o DMEM e o DPBS proporcionam um ambiente mais propício para o resfriamento por 24 h de ovários bovinos. Além disso, a adição de SFB ao DPBS pode aumentar ainda mais a qualidade do meio e, consequentemente, a viabilidade dos oócitos. Assim, é possível definir que o DMEM e o DPBS pode garantir a qualidade oocitária de ovários bovinos durante um armazenamento a 4-6°C por 24 h.

REFERÊNCIAS

- ABIEC, Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Exportações Brasileiras de Carne Bovina no Período: jan/2017 – set/2017. Disponível: <http://www.abiec.com.br/ExportacoesPorAno.aspx> >. Acessado em 24/10/2017.
- ADAMS, G.P.; SINGH, J.; BAERWALD, A.R. Large animal models for the study of ovarian follicular dynamics in women. **Theriogenology**, v.78, p.1733–1748, 2012.
- BASSO, A.C.; GARCIA, J.M.; ESPER, C.R. Efeito de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* o crescimento de folículos pré-antrais isolados de ovários de fetos bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, p.134–143, 2007.
- BERTAGNOLLI, A.C.; GONÇALVES, P.B.D.; GIOMETTI, I.C.; COSTA, L.F.S.; OLIVEIRA, J.F.C.; GONÇALVES, I.D.V.; BARRETO, K.P.; EMANUELLI, I.P.; BORGES, L.F.K. Interação entre células do cumulus e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, p.488–496, 2004.
- BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L.A.; SIRARD, M.A. *In vitro* production of bovine embryos: Developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, v. 47, p. 1061–1075, 1997.
- BOHLOOLI, S.H.; BOZOĞLU, Ş.; CEDDEN, F. HEPES buffer in ovary-transportation medium influences developmental competence of cattle oocytes. **South African Journal of Animal Science**, v. 45, p. 5–11, 2015.
- BORGES, A.A.; SANTOS, M.L.T.; QUEIROZ NETA, L.B.; SANTOS, M.V.O.; FEITOSA, A.K.N.; PEREIRA, A.F. Oócitos bovinos selecionados *in vitro* com uso do azul cresil brilhante (BCB) submetidos a diferentes períodos de exposição. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, p. 234, 2014.
- BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F.; DRESSEL, M.A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 147–158, 1982.
- CAIXETA, E.S.; DODE, M.A.N. Avaliações da competência ovocitária em bovinos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, p. 8–18, 2010.
- CAVALIERI, F.L.B.; ANDREAZZI, M.A.; COLOMBO, A.H.B.; EMANUELLI, I.P.; MORESKI, D.A.B.; SILVA, W.M. Estudo sobre o cultivo *in vitro* de embriões bovinos durante o transporte. **ARS Veterinária**, v. 31, p. 7–11, 2015.
- CELESTINO, J.J.H.; SANTOS R.R.; MARTINS, F.S.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO; COSTA, S.H.F.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R. Conservação de folículos pré-antrais bovinos em solução salina 0,9% ou TCM 199. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 591–599, 2007.

CHACUR, M.G.M.; VALENTIM, N.C.; MARTINEZ, A.I.S.; TOSTES, R.A.; KRONKA S. N. Morfometria de ovários de fêmeas zebu *Bos taurus indicus* coletados em matadouro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 65–70, 2006.

CHAGAS, V.M.; SILVA, M.A.V.; MARTINS, J.H.; SANTOS, C.S.; AGUIAR, H.M.V.S.B.; BARROS, C.H.S.C.; CHAVES, R.M.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S. Fatores anatomofisiológicos que afetam a qualidade oocitária em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p.34–38, 2014.

CHANG, M.C. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. **Nature**, v. 184, p. 466–467, 1959.

CHAVES, R.N.; DUARTE, A.B.G.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO, J.R. Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 37–49, 2010.

CROCOMO, L.F.; MARQUES FILHO, W.C.; LANDIM ALVARENGA, F.C.; BICUDO, S.D. Peculiaridades da coleta de oócitos para produção *in vitro* de embriões ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, p. 25–31, 2012.

DEMEESTERE, I.; CENTNER J.; GERVY, C.; ENGLERT, Y.; DALBAERE, A. Impact of various endocrine and paracrine factors on *in vitro* culture of preantral follicles in rodents. **Reproduction**, v. 130, p. 147–156, 2005.

DODE, M.A.N.; RUMPF, R. Produção *in vitro* de embriões na Espécie bovina. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 26, p. 32–37, 2002.

FAUSTINO, L.R.; SILVA, C.M.G.; ROSSETTO, R.; RODRIGUES, G.Q.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 3–15, 2011.

FIGUEIREDO, J.R.; CELESTINO, J.J.H.; RODRIGUES, A.N.R.; SILVA, J.R.V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 143–152, 2007.

FREITAS, V.J.F.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; MERMILLOD, P.; MELO, L.M.; TEIXEIRA, D.I.A. Estado da arte e perspectivas da produção *in vitro* de embriões em caprinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v. 41, p. 201–207, 2017.

FUKUDA, Y.; ICHIKAWA, M.; NAITO K.; TOYODA Y. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with *cumulus* cells *in vitro* up to the blastocyst stage. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 114–119, 1990.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, p. 599–616, 2003.

GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; BERLINGUER, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; ESTESO, M. C.; MERMILLOD, P.; ORTIZ, J. A.; RAMON, M.; PÉREZ-GUZMÁN, M.D.; GARDE, J. J.; SOLER, A. J. Effect of storage temperature during transport of ovaries on *in vitro* embryo production in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). **Theriogenology**, v.75, p.65–72, 2011.

GASTAL, G.D.A.; ALVES, B.G.; ALVES, K.A.; SOUZA, M.E.M.; VIEIRA, A.D.; VARELA JR, A.S.; FIGUEIREDO, J.R.; FEUGANG, J.M.; LUCIA JR, T.; GASTAL, E.L. Ovarian fragment sizes affect viability and morphology of preantral follicles during storage at 4°C. **Reproduction**, v.153, p. 577–587, 2017.

GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.R.; SANDRI, L.R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A.Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 212–217, 2007.

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. 2. Ed. São Paulo: Varela, p. 340, 2008.

GSTRAUNTHALER, G. Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum: Serum-free Cell Culture. **ALTEX**, v. 20, p. 25-281, 2003.

GUIGNOT, F.; BEZARD, J.; PALMER, E. Effect of time during transport of excised mare ovaries on oocyte recovery rate and quality after *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v. 52, n. 5, p. 757–766, 1999.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal, v. 43, 2015. Disponível: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2015/default.shtm>. Acessado em 30/08/2017.

IETS, International Embryo Transfer Society. Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Embryo Transfer Newsletter, v. 32, p. 14–26, 2014.

KIM, H.J.; CHOI, S.H.; SON, D.S.; CHO, S.R.; CHOE, C.Y.; KIM, Y.K.; HAN, M.H.; RYU, I.; KIM, I.C.; KIM, I.; IM, K.S.; NAGAI, T. Effect of exposure duration of ovaries and oocytes at ambient temperature on partheno-genetic development of porcine follicular oocytes. **Journal of Reproduction**, v. 52, p. 633–638, 2006.

LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MAZIERO, R.R.D. Control of oocyte maturation. **Animal Reproduction**, v.11, p.150–158, 2014.

LIMA, J.M.P.; SANTOS, F.A.; PIMENTEL, M.M.L.; BEZERRA, M.B. Progresso metodológico e sua influência na produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, p. 135–140, 2014.

LIN, Y.; TSAI, H. B.; LIAO, M. H.; CHEN, M. C. Effects of preservation media on *in vitro* maturation of porcine oocytes. **Chinese Journal of Physiology**, v. 54, p.1–6, 2011.

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**, v. 61, p. 461–472, 2004.

MACEDO, L.O.B. Modernização da pecuária de corte bovina no Brasil e a importância do crédito rural. **Agroanalysis**, v. 25, p. 35–36, 2006.

MACHADO, E.S.; CÉZAR, J.M.; OLIVEIRA, L.; TEIXEIRA, L.S.; LIMA, T.A. Técnicas de melhoramento genético em bovinos para o aumento na produção de leite. **Interfaces Científicas - Saúde e Ambiente**, v.2, p. 81–87, 2014.

MACHATY, Z.; PEIPPOB, J.; PETER, A. Production and manipulation of bovine embryos: techniques and terminology. **Theriogenology**, v. 78, p. 937–950, 2012.

MAO, J.; WU, G.; SMITH, M.F.; MCCAULEY, T.C.; CANTLEY, T.C.; PRATHER, R.S.; DIDION, B.A.; DAY, B.N. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 67 p. 1197–1203, 2002.

MATSUSHITA, S.; TANI, T.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Effect of low-temperature bovine ovary storage on the maturation rate and developmental potential of follicular oocytes after *in vitro* fertilization, parthenogenetic activation, or somatic cell nucleus transfer. **Animal Reproduction Science**, v. 84, p.293–301, 2004.

MELLO, R.R.C.; FERREIRA, J.E.; SOUSA, S.L.G.; MELLO, M.R.B.; PALHANO, H.B. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, p. 58–64, 2016.

MORENO, D.; NEIRAA, A.; DUBREIL, L.; LIEGEOIS, L.; DESTROMELLE, S.; MICHAUD, S.; THORIN, C.; BRIAND-AMIRAT, L.; BENCHARIF, D.; TAINTURIER, D. *In vitro* bovine embryo production in a synthetic medium: embryo development, cryosurvival, and establishment of pregnancy. **Theriogenology**, v. 84, p. 1053–1060, 2015.

MOTTA, L.C.B.; MENDES, R.J.; GARCIA, F.A.C.; SILVA, J.R.F. Avaliação histológica da viabilidade de folículos ovarianos suínos submetidos a diferentes condições de transporte. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 11, p. 75–86, 2017.

NAKAO, H.; NAKATSUP, N. Effects of storage conditions of bovine ovaries and oocytes on the success rate of *in vitro* fertilization and culture. **Journal of Reproduction and Development**, v. 38, p. 11–13, 1992.

NAOI, H.; OTOI, T.; SHIMAMURA, T.; KARJA, N. D. K.; AGUNG, B.; SHIMIZU, R.; TANIGUCHI, M.; NAGAI, T. Developmental competence of cat oocytes from ovaries stored at various temperature for 24 h. **Journal of Reproduction and Development**, p. 271-277, 2007.

OPIELA, J.; KAŁSKA-KSIAŻKIEWICZ, L.; LIPINSKI, D.; SŁOMSKI, R.; BZOWSKA, M.; RYŃSKA, B. Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 546–555, 2008.

PALHANO, H.B. **Reprodução em bovinos: fisiopatologia, terapêutica, manejo e biotecnologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Editora LF Livros, 2008, p.181–224.

PEDERSEN, H.G.; WATSON, E.D.; TELFER, E.E. Effect of ovary holding temperature and time on equine granulosa cell apoptosis, oocyte chromatin configuration and *cumulus* morphology. **Theriogenology**, v.62, p.468–480, 2004.

PEREIRA, L.M.C.; BERSANO, P.R.O.; LOPES, M.D. Influência da temperatura de transporte de ovários na maturação *in vitro* de oócitos caninos coletados em diferentes estágios do ciclo estral. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 52, p. 158–166, 2015.

PEREIRA, M.M.; COSTA, F.Q.; OLIVEIRA, A.P.; SERAPIÃO, R.V.; MACHADO M.A.; VIANA, J.H. M.; CAMARGO, L.S.A. Quantificação de transcritos maternos em oócitos bovinos submetidos a diferentes condições de maturação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 1394–1400, 2010.

PICTON, H.M.; HARRIS, S.E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E.L. The *in vitro* growth and maturation of follicles. **Reproduction**, v. 136, p. 703–715, 2008.

RODRIGUES, G.Q.; BRUNO, J.B.; FAUSTINO, L.R.; SILVA, C. M. G.; FIGUEIREDO, J. R. Suplementação proteica no meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, p. 341–349, 2010.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 229–233, 2007.

SALEHI, P.; SPRATLIN, J.; CHONG, T.F.; CHURCHILL, T.A. Beneficial effects of supplemental buffer and substrate on energy metabolism during small bowel storage. **Cryobiology**, v. 48, p.245–253, 2004.

SANTOS, M.V.O.; BORGES, A.A.; QUEIROZ NETA, L.B.; PEREIRA, A.F. Influência do método de recuperação oocitária sobre os parâmetros quanti-qualitativos de oócitos bovinos. **ARS veterinária**, v. 32, 105–109, 2016.

SANTOS, M.V.O.; QUEIROZ NETA, L.B.; BORGES, A.A.; PEREIRA, A.F. Influence of commercially available follicle stimulating hormone on the *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, p. 1393–1402, 2017.

SANTOS, R.R.; SILVA, J.R.V.; COSTA, S.H.F.; RODRIGUES, A.P.R.; LÔBO, R.N.B.; FIGUEIREDO, J.R. Effect of 0.9% saline solution and phosphate buffer saline at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicle. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 254–259, 2002.

SAVVATEEVA, M.; DEMIN, A.M.; KRASNOV, V.P.; BELYAVSKY, A.V. Magnetic stromal layers for enhanced and unbiased recovery of co-cultured hematopoietic cells. **Analytical Biochemistry**, v. 509, p. 146–155, 2016.

SCANAVEZ, A.L.; CAMPOS, C.C.; SANTOS, R.M. Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 722–728, 2013.

SHABANKAREH, H.K.; AZIMI, G.; TORIKI, M. Developmental competence of bovine oocytes selected based on follicle size and using the brilliant cresyl blue (BCB) test. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v.12, p.771–778, 2014.

SHELKE, G.V.; LÄSSER, C.; GHOSH, Y. S.; LÖTVALL, J. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. **Journal of Extracellular Vesicles**, v.3, 2014.

SILVA, J.R.V.; BRASIL, A.F.; SANTOS, R.R.; COSTA, S.H.F.; RODRIGUES, A.P.R.; FERREIRA, M.A.L.; MACHADO, V.P.; FIGUEIREDO, J.R. Degeneration rate of goat primordial follicles maintained in TCM 199 or PBS at different temperatures and incubation times. **Ciência Rural**, v. 33, p. 913–919, 2003.

SIRARD, M.A.; COENEN, K. The co-culture of cumulus-enclosed bovine oocytes and hemisections of follicles: effects on meiotic resumption. **Theriogenology**, v. 40, p.933–942, 1993.

SOUZA-FABIAN, J.M.G.; PANNEAU, B.; DUFFARD, N.; LOCATELLI, Y.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F.; MERMILLOD, P. *In vitro* production of small ruminant embryos: Late improvements and further research. **Theriogenology**, v. 81, p. 1149–1162, 2014.

STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G. Birth after the reimplantation of a human embryo. **Lancet**, v. 312, p. 366, 1978.

TAS, M.; EVECEN, M.; OZDAS, O. B.; CIRIT, U.; DEMIR, K.; BIRLER, S.; PABUCCUOĞLU, S. Effect of transport and storage temperature of ovaries on *in vitro* maturation of bitch oocytes. **Animal Reproduction**, v. 96, p. 30–34, 2006.

TELFER, E.E.; BINNIE, J.P.; MCCAFFERY, F.H.; CAMPBELL, B.K. *In vitro* development of oocytes from porcine and bovine primary follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, p.117–123, 2000.

TOYODA, Y.; CHANG, M.C. Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 31, p. 9–22, 1974.

TRINDADE, M.C.; MACENTE B.I.; VICENTE, W.R.R., APPARÍCIO M. Estresse oxidativo na produção *in vitro* de embriões bovinos: revisão de literatura. **Investigação**, v. 15, p.37–45, 2016.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.100–109, 2008.

VIANA, J.H.M.; FIGUEIREDO, A.C.S.; SIQUEIRA, L.G.B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v. 14, p. 476–481, 2017.

WHITTINGHAM, D.C. Fertilization of mouse eggs *in vitro*. **Nature**, v. 220, p. 592–593, 1968.

WONGSRIKEAO, P.; OTOI, T.; KARJA, N.W.K.; AGUNG, B.; NII, M.; NAGAI, T. Effects of ovary storage time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, p. 87–97, 2005.

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

APÊNDICE A – Resumo científico apresentado no XXII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, realizado em Santos-SP, de 10 a 12 de maio de 2017.

**Influência do soro fetal bovino sobre a viabilidade das células do *cumulus* de oócitos
bovinos recuperados de ovários resfriados**

Alzira Regina Silva de Deus*, Maria Bárbara Silva, Lhara Ricarliany Medeiros de Oliveira,
Luanna Lorena Vieira Rodrigues, Maria Diana Cáritas Barros dos Santos, Maria Valéria de
Oliveira Santos, Luiza Bento de Queiroz Neta, Alana Azevedo Borges, Alessandra Fernandes
Pereira

Laboratório de Biotecnologia Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró,
RN, Brasil. *E-mail: alziraregina@hotmail.com

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem sido amplamente utilizada por proporcionar várias vantagens aos programas de reprodução animal. Nesse sentido, uma importante fonte de ovários para a realização da PIVE são os abatedouros, os quais muitas vezes encontram-se distantes dos laboratórios. Dessa forma, as condições de transporte dos ovários, especialmente por longos períodos de tempo, podem levar a uma perda na viabilidade dos oócitos. Portanto, torna-se importante o estabelecimento de meios e suplementações capazes de manter as características de qualidade oocitária, como a viabilidade das células do *cumulus* (CCs). Assim, o objetivo foi avaliar a influência do soro fetal bovino (SFB) em meio simples [solução tampão fosfato (PBS)] e complexo [meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM)] durante o resfriamento (4–6°C) por 24 h de ovários bovinos sobre a viabilidade das CCs. Para tanto, dois experimentos foram realizados, onde no experimento I foram comparados ovários resfriados em PBS, PBS suplementado com 10% de SFB e não resfriado (controle). Já no experimento II, foram avaliados ovários resfriados em DMEM, DMEM suplementado com 10% de SFB e não resfriado (controle). Os ovários foram obtidos em abatedouro e transportados imediatamente ao laboratório em solução salina (NaCl 0,9%; 35–37°C). Para o resfriamento, ovários foram divididos aleatoriamente entre os grupos e armazenados por 24 h a 4–6°C. Todos os ovários foram submetidos à aspiração folicular (agulha 21G/seringa 5 mL) para recuperação oocitária. Os oócitos apresentando uma ou mais camadas de CCs foram selecionados e submetidos à desagregação mecânica para formação de uma suspensão de CCs. Em seguida, as células foram coradas com azul de tripano (0,2%) e

visualizadas em câmara de Neubauer sob microscopia óptica. Assim, células vivas (incolor) e mortas (azul) foram contadas. A taxa de viabilidade (n° de células vivas/total de células contadas*100) foi analisada pelo teste de chi-quadrado ($P<0,05$) considerando cinco repetições por experimento. No experimento I, um total de 108 ovários foi utilizado, onde o grupo resfriado na presença de SFB apresentou CCs com viabilidade de $46,3\% \pm 3,3$, a qual foi significativamente superior ao grupo resfriado com PBS que apresentou $41,7\% \pm 1,4$ de células viáveis ($P<0,05$). Além disso, o resultado do grupo PBS/SFB, apesar da diferença estatística, mostrou uma maior proximidade ao grupo controle ($49,0\% \pm 2,8$). No experimento II, 109 ovários foram distribuídos entre os grupos, onde o DMEM/SFB também apresentou melhor viabilidade das CCs em comparação ao grupo resfriado apenas com DMEM ($42,0\% \pm 8,2$ vs. $34,5\% \pm 8,8$; $P<0,05$), os quais foram inferiores ao controle ($51,7\% \pm 3,2$). Diante dos resultados, observou-se que o processo de resfriamento ovariano influenciou negativamente a viabilidade celular. Além disso, meios acrescidos de suplementação proteica, como o SFB, garantem melhores condições para a manutenção das CCs e, portanto, da qualidade oocitária. Assim, pode-se concluir que a adição de SFB ao meio de resfriamento de ovários bovinos por 24 h proporciona um melhor ambiente para manutenção da viabilidade das CCs.

Palavras-chave: azul de tripano, DMEM, PBS, suplementação proteica.

Keywords: trypan blue, DMEM, PBS, protein supplementation.

APÊNDICE B – Resumo científico apresentado no Encontro de Biotecnologia do Nordeste (RENORBIO), realizado em Natal-RN, de 08 a 11 de agosto de 2017.

Influência do soro fetal bovino no meio de resfriamento ovariano sobre a qualidade de oócitos bovinos

Alzira Regina Silva de Deus, Maria Bárbara Silva, Lhara Ricarliany Medeiros de Oliveira, Luanna Lorena Vieira Rodrigues, Maria Valéria de Oliveira Santos, Luiza Bento de Queiroz Neta, Alana Azevedo Borges, Alexsandra Fernandes Pereira

Laboratório de Biotecnologia Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil. E-mail: alziraregina@hotmail.com

A recuperação de oócitos para a produção *in vitro* de embriões bovinos pode ser realizada usando fêmeas *in vivo* ou *post-mortem*. Nesse último caso, os abatedouros possuem grande importância em virtude da disponibilidade de ovários. Contudo, a localização desses abatedouros é algumas vezes distante, necessitando de condições adequadas para o transporte de ovários por longos períodos. Essas condições envolvem o uso de meios e suplementações que precisam ser estabelecidos para manter a qualidade oocitária. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência do soro fetal bovino (SFB) em meio simples [solução tampão fosfato (PBS)] durante o resfriamento de ovários bovinos sobre os parâmetros qualitativos e quantitativos de oócitos. Para tanto, ovários derivados de fêmeas de abatedouro foram divididos aleatoriamente nos grupos: resfriamento em PBS [PBS], resfriamento em PBS suplementado com 10% de SFB [PBS-SFB] e não resfriado [controle]. Para o resfriamento, ovários foram armazenados a 4–6°C por 24 h. Posteriormente, todos os ovários foram submetidos à aspiração folicular (agulha 21G e seringa de 5,0 mL) e os oócitos recuperados foram classificados de acordo com a morfologia em viáveis [uma ou mais camadas de células do *cumulus* (CCs) e citoplasma homogêneo] e não viáveis [parcialmente ou completamente desnudos com citoplasma homogêneo ou heterogêneo)]. Além disso, a qualidade também foi avaliada pelo ensaio de azul de cresil brilhante (ACB), no qual oócitos apresentando citoplasma azul foram classificados como viáveis (ACB⁺) e sem coloração foram considerados não viáveis (ACB⁻). Para a avaliação da viabilidade das CCs, oócitos viáveis foram submetidos à desagregação mecânica, a suspensão celular foi corada com azul de tripan (0,2%) e visualizada em câmara de Neubauer. Assim, células vivas (incolor) e

mortas (azul) foram contadas. Para análise estatística ($P < 0,05$) foi utilizado o teste exato de Fisher e teste de chi-quadrado (viabilidade das CCs). Após cinco repetições, um total de 108 ovários foi recuperado e dividido entre os grupos. Inicialmente, a presença de SFB [PBS-SFB] influenciou positivamente a taxa de recuperação ($41,2\% \pm 2,1$) quando comparada ao grupo PBS ($32,8\% \pm 3,4$), sendo o primeiro similar ao controle ($42,0\% \pm 5,0$). Na avaliação morfológica, nenhuma diferença foi observada entre os grupos (controle: $67,5\% \pm 4,8$; PBS-SFB: $68,7\% \pm 4,9$; PBS: $60,0\% \pm 6,2$), assim como na avaliação pelo ensaio de ACB (controle: $40,3\% \pm 8,1$; PBS-SFB: $44,4\% \pm 4,6$; PBS: $42,6\% \pm 3,7$). Já na viabilidade das CCs, embora o resfriamento tenha afetado a viabilidade das CCs dos oócitos recuperados (controle: $49,0\% \pm 2,8$), um maior percentual de células viáveis foi observado nos oócitos derivados de ovários resfriados em PBS-SFB ($46,3\% \pm 3,3$) quando comparado ao grupo PBS ($41,7\% \pm 1,4$). Em conclusão, a adição de SFB ao meio de resfriamento de ovários bovinos por 24 h proporciona um melhor ambiente para manutenção da qualidade oocitária.

Suporte financeiro: CNPq e CAPES.

Palavras chaves: Produção *in vitro* de embriões, recuperação oocitária, ensaios de coloração, suplementação proteica.