

INFLUÊNCIA DOS MEIOS DE ESTOCAGEM DURANTE O TRANSPORTE DE OVÁRIOS BOVINOS A 4°C SOBRE A RECUPERAÇÃO E QUALIDADE OOCITÁRIA

INFLUENCE OF STORAGE MEDIA DURING TRANSPORT OF BOVINE OVARIES AT 4°C ON OOCYTE RECOVERY AND QUALITY

A. R. S. DEUS¹, M. B. SILVA², M. V. O. SANTOS³, L. B. QUEIROZ NETA⁴,
A. A. BORGES⁵, A. F. PEREIRA⁶

RESUMO

O objetivo foi avaliar diferentes meios na presença e ausência de soro fetal bovino (SFB; 10%) durante o transporte por 24 h de ovários a 4°C sobre a recuperação e a qualidade oocitária bovina. Cinco experimentos foram realizados comparando: (E1) NaCl vs. NaCl+SFB vs. controle (não resfriado), (E2) PBS vs. PBS+SFB vs. controle, (E3) DMEM vs. DMEM+SFB vs. controle, (E4) DPBS vs. DPBS+SFB vs. controle e (E5) melhores resultados dos experimentos anteriores. Após a aspiração folicular, oócitos foram avaliados quanto à qualidade por critérios morfológicos e ensaio de azul cresil brilhante. Ainda, células dos *cumulus* de oócitos viáveis foram avaliadas quanto à viabilidade pelo azul de tripan. No E1, NaCl permitiu uma maior taxa de recuperação em relação ao NaCl+SFB (46,0% vs. 39,6%), enquanto que os demais parâmetros não foram alterados. Já no E2, o SFB em PBS influenciou positivamente a taxa de recuperação (41,2% vs. 32,8%) e a viabilidade celular (46,3% vs. 41,7%), quando comparado ao PBS. No E3, o SFB em DMEM teve uma influência negativa sobre a taxa de recuperação (39,9% vs. 40,7%) e avaliação morfológica (59,0% vs. 73,1%). Contudo, a adição de SFB ao DMEM se mostrou benéfica à viabilidade celular (42,0% vs. 34,5%). Em relação ao E4, a presença de SFB em DPBS influenciou positivamente a viabilidade celular (50,7% vs. 47,0%). Já no E5, comparando os melhores grupos [NaCl, PBS+SFB, DMEM, DPBS+SFB], a viabilidade celular mostrou uma maior porcentagem em DMEM (54,0%) e DPBS (54,5%), quando comparada a NaCl (48,3%) e PBS (50,1%). Em conclusão, a presença do SFB em meios com alta capacidade de tamponamento (PBS e DPBS) pode se mostrar benéfica. Contudo, DMEM e DPBS resultam num ambiente mais propício para o resfriamento de ovários bovinos.

PALAVRAS-CHAVE: Oócitos imaturos. Resfriamento ovariano. Soro fetal bovino.

SUMMARY

The aim was to evaluate different media in the presence and absence of fetal bovine serum (FBS; 10%) during 24 h transport of ovaries at 4°C on bovine oocyte recovery and quality. Five experiments were performed comparing: (E1) NaCl vs. NaCl+FBS vs. control (not cold), (E2) PBS vs. PBS+FBS vs. control, (E3) DMEM vs. DMEM+FBS vs. control, (E4) DPBS vs. DPBS+FBS vs. control and (E5) better results from previous experiments. After follicular aspiration, oocytes were evaluated for quality by morphological criteria and brilliant cresyl blue assay. Also, *cumulus* cells of viable oocytes were evaluated for viability by trypan blue. In E1, NaCl allowed a higher rate of recovery compared to NaCl+FBS (46.0% vs. 39.6%), while the other parameters were not altered. Already in E2, FBS in PBS positively influenced recovery rate (41.2% vs. 32.8%) and cell viability (46.3% vs. 41.7%) when compared to PBS. In E3, FBS in DMEM had a negative influence on the recovery rate (39.9% vs. 40.7%) and morphological evaluation (59.0% vs. 73.1%). Nevertheless, the addition of SFB to DMEM was shown to be beneficial to cell viability (42.0% vs. 34.5%). Regarding E4, the presence of FBS in DPBS positively influenced cell viability (50.7% vs. 47.0%). Already in E5, comparing the best groups (NaCl, PBS+FBS, DMEM, DPBS+FBS), cell viability showed a higher percentage in DMEM (54.0%) and DPBS (54.5%) when compared to NaCl (48.3%) and PBS (50.1%). In conclusion, the presence of FBS in media with high buffering capacity (PBS and DPBS) may show to be beneficial. Nevertheless, DMEM and DPBS result in an environment more favorable to the cooling of bovine ovaries.

KEY-WORDS: Immature oocytes. Ovarian cooling. Fetal bovine serum.

¹ Discente do Curso de Biotecnologia, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brasil.

² Discente do Curso de Biotecnologia, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil.

³ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil.

⁴ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil.

⁵ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil.

⁶ Docente do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde e do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil. Autor para correspondência: alexsandra.pereira@ufersa.edu.br.

INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) apresenta inúmeras aplicações aos programas de reprodução em bovinos, uma vez que o seu uso permite a obtenção de um grande número de indivíduos com elevado mérito genético em um curto período de tempo (MACHADO et al., 2014). Devido às aplicações da PIVE, vem se buscando constantemente o aumento da eficiência das suas etapas, as quais são: colheita de oócitos de folículos antrais, maturação oocitária *in vitro*, fecundação *in vitro*, desenvolvimento *in vitro*, inovulação embrionária e nascimento de crias (VARAGO et al., 2008).

Inicialmente, para a realização da PIVE, a obtenção de oócitos pode ser realizada a partir de fêmeas vivas (VIANA et al., 2017) ou *post-mortem* (SANTOS et al., 2016). Esta última representa uma importante fonte de oócitos, especialmente quando coletados de ovários de abatedouros, os quais apresentam ampla disponibilidade, embora algumas vezes encontram-se distantes dos laboratórios (SANTOS et al., 2017). Dessa forma, durante o transporte dos ovários até o laboratório as células podem sofrer apoptose e, conseqüentemente, causar perda do material biológico, bem como a diminuição da qualidade e da viabilidade dos oócitos (CAVALIERI et al., 2015).

Nesse contexto, torna-se importante o desenvolvimento de metodologias simples para diminuir as perdas sofridas durante o tempo de transporte dos ovários. Assim, o resfriamento de ovários inteiros em diferentes meios, suplementados ou não, surge como uma importante alternativa para manter a qualidade dos ovários até o momento do processamento, mantendo uma boa viabilidade oocitária (LUCCI et al., 2004). Dentre os meios que podem ser utilizados, existem àqueles de composição mais simples, como solução tampão fosfato (PBS) e solução de cloreto de sódio a 0,9% (NaCl), bem como os meios mais complexos, 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 uma fonte proteica, como o soro fetal bovino (SFB), a fim de promover o aumento da viabilidade folicular (RODRIGUES et al., 2010). Contudo, há poucas informações sobre os efeitos desse tipo de suplementação associada ao melhor meio para o resfriamento. Portanto, objetivou-se avaliar os efeitos de diferentes meios na presença e ausência de SFB durante o armazenamento por 24 h de ovários a 4°C sobre a recuperação e a qualidade oocitária bovina.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados de acordo com a aprovação do Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA, no. 23091.001069/2015-79). Os reagentes e soluções utilizados na presente pesquisa foram adquiridos da Gibco-BRL (Carlsbad, EUA) e Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Um total de 532 ovários de fêmeas bovinas adultas, mestiças provenientes de abatedouro local foi

distribuído aleatoriamente nos cinco experimentos. Em cada experimento, com cinco repetições para cada experimento, um diferente meio-base foi empregado, sendo eles: experimento E1: solução de NaCl a 0,9%, experimento E2: PBS de composição 8,0 mg/mL NaCl, 0,2 mg/mL KCl, 1,4 mg/mL Na₂HPO₄ e 0,2 mg/mL KH₂PO₄, experimento E3: DMEM de composição conforme código Gibco 12800-017, experimento E4: DBPS de composição conforme código Sigma-Aldrich D8662 e experimento E5: melhores meio-base observados nos experimentos anteriores.

Os ovários foram distribuídos aleatoriamente nos grupos não resfriado (controle) e resfriados a 4°C por 24 h em meio-base suplementado ou não com 10% de SFB, perfazendo três grupos para cada experimento. O tempo de 24 h foi definido de acordo com estudo relatado por Scherthaner *et al.* (1997) que não observaram nenhum efeito negativo após esse período de armazenamento sobre a competência de desenvolvimento embrionário.

Após o abate, os ovários recuperados foram transportados ao laboratório em solução salina (NaCl 0,9%) a 35-37°C em um tempo máximo de 1 h. No laboratório, os mesmos foram lavados em uma nova solução e selecionados macroscopicamente quanto à presença de folículos ovarianos e aparência morfológica normal (SANTOS et al., 2016). Em seguida, os ovários destinados aos grupos resfriados foram armazenados em tubos contendo aproximadamente 40 mL de meio e mantidos em refrigerador por 24 h a 4°C. Os ovários do grupo controle foram processados imediatamente. Decorrido o período de armazenamento, os tubos contendo os ovários foram transferidos para um banho-maria (37°C por 15 min) para aquecimento e, em seguida, iniciou-se a aspiração folicular. Para tanto, utilizou-se agulha 21G e seringa de 5,0 mL e somente os folículos com 2-8 mm de diâmetro foram aspirados. Posteriormente, o líquido folicular foi mantido em repouso por 15 min para sedimentação das estruturas. Decorrido esse tempo, o conteúdo sedimentado foi visualizado em estereomicroscópio (Physis[®]; aumento de 20x a 40x) para recuperação das estruturas.

A partir disso, os oócitos foram classificados quanto à qualidade inicialmente pela morfologia convencional, onde aqueles com três ou mais camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo foram considerados viáveis de grau I; com 1-2 camadas de células do *cumulus* 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).

Em seguida, a qualidade foi também avaliada pelo ensaio de azul cresil brilhante, ACB (SANTOS et al., 2016). Esse corante tem a capacidade de selecionar oócitos imaturos crescidos aptos para a maturação através da atividade intracelular da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Essa enzima tem alta atividade em oócitos em fase inicial de desenvolvimento e baixa atividade em oócitos imaturos crescidos.

Portanto, a G6PDH, que está relacionada ao metabolismo da glicose, tem a capacidade de reduzir o ACB de azul para incolor, fazendo com que oócitos em fase inicial de crescimento permaneçam sem coloração (não viáveis), enquanto que os oócitos imaturos crescidos aptos para a maturação apresentem uma coloração azul em seu citoplasma (viáveis) (SHABANKAREH et al., 2014). Em oócitos imaturos antes da maturação, a redução da atividade da G6PDH evidencia que essa enzima tem sua atividade reduzida pelo fim do crescimento oocitário necessário durante o desenvolvimento folicular. Assim, oócitos foram lavados e incubados em gotas de 300 µL de ACB (26 µM) por 60 min a 38,5°C. Decorrido o tempo, as estruturas foram avaliadas sob estereomicroscópio e àquelas que apresentaram citoplasma azul foram classificadas como viáveis (ACB⁺), enquanto as que não apresentaram coloração no citoplasma foram consideradas não viáveis (ACB⁻) (OPIELA et al., 2008).

Finalmente, foi realizada a avaliação de viabilidade das células do *cumulus* pelo ensaio de azul de tripan. Portanto, oócitos selecionados morfológicamente como viáveis foram submetidos à desagregação mecânica das células do *cumulus* por sucessivas pipetagens, resultando em uma suspensão celular. Posteriormente, a suspensão foi submetida à coloração com azul de tripan (0,2%) para avaliação da viabilidade em câmara de Neubauer, onde as células presentes nos quatro quadrantes externos foram contabilizadas. Assim, células que apresentaram coloração azul foram consideradas mortas e células sem coloração foram consideradas vivas (SANTOS et al., 2006).

Para análise estatística, todos os dados foram expressos como médias percentuais de cinco repetições ± erro padrão e analisados usando o software Graphpad InStat 3.06 (GraphPad Software Inc., La Jolla, EUA). Para os dados de taxa de recuperação oocitária (oócitos recuperados/folículos aspirados) e as taxas de oócitos

viáveis (oócitos viáveis/total de oócitos recuperados) por classificação morfológica e ensaio de ACB foram analisados pelo teste exato de Fisher. Já os dados de viabilidade das células do *cumulus* (células viáveis/total de células contadas) foram analisados pelo teste do chi-quadrado, em virtude do maior tamanho da amostragem, ou seja, número de células contadas. Diferenças entre os grupos em cada experimento foram consideradas significativas quando P<0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a avaliar os efeitos do soro fetal bovino (SFB) em meios simples e complexos sobre o resfriamento de ovários inteiros bovinos por longo período de tempo, evidenciando que meios na presença de SFB contribuem para que a falta de suporte vascular não acarrete em mudanças drásticas em parâmetros de qualidade oocitária (MAO et al., 2002). Contudo, em situações de necessidade, meios simples podem ser usados, pois apesar de menos eficientes, ainda conseguem conservar a qualidade oocitária e a taxa de recuperação.

No primeiro experimento (E1, Tabela 1), observou-se que a quantidade de oócitos recuperados foi afetada quanto à presença de SFB no meio de resfriamento, onde este teve uma influência negativa na taxa de recuperação de oócitos viáveis e não viáveis, em que uma maior taxa foi evidenciada no grupo de ovários resfriados apenas com NaCl. Contudo, o resfriamento não afetou a qualidade oocitária e a viabilidade das células do *cumulus* em nenhum dos grupos avaliados, independente do meio de estocagem. Desta forma, o grupo NaCl na ausência de SFB, que não apresentou resultado negativo em nenhum parâmetro, foi usado no quinto experimento.

Tabela 1 – 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	Qualidade oocitária		Viabilidade das células do <i>cumulus</i>
		Viáveis por avaliação morfológica	Viáveis por ensaio de ACB	
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	46,0 ± 3,4 (287/624) ^b	67,2 ± 5,2 (193/287) ^b	38,2 ± 4,8 (92/241) ^a	50,3 ± 2,4 (2125/4221) ^a
NaCl/SFB	39,6 ± 4,4 (242/611) ^a	66,9 ± 2,4 (162/242) ^b	39,6 ± 4,1 (76/192) ^a	49,6 ± 0,5 (2824/5691) ^a

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

O uso de NaCl como meio para armazenamento de ovários inteiros a temperaturas de resfriamento são controversos. Matsushita *et al.* (2004) utilizaram apenas NaCl para o armazenamento a 10°C por 24 h de ovários bovinos e não observaram diferença na maturação dos oócitos e desenvolvimento de blastocistos em comparação com os ovários derivados do grupo controle (não resfriados). Já Hara *et al.* (2015) obtiveram uma menor taxa de clivagem e blastocistos quando os ovários

foram armazenados em NaCl por 22-26 h a 12-14°C. No presente trabalho, nossos resultados indicaram que o NaCl pode ser empregado no resfriamento de ovários inteiros bovinos.

Além disso, a presença do SFB em NaCl, que torna o meio mais nutritivo, não mostrou diferenças nos resultados de qualidade oocitária; por outro lado, mostrou-se inferior quanto à recuperação dos oócitos através da aspiração folicular. Esse resultado não

afirma que o SFB não tenha uma ação positiva no resfriamento de ovários em NaCl, mas que esses efeitos somente poderão ser visualizados em análises mais específicas sobre os oócitos, uma vez que a taxa de recuperação é um parâmetro apenas quantitativo e inicial. Wongsrikeao *et al.* (2005) observaram que o longo período de armazenamento em um meio pobre de nutrientes, como o NaCl a 0,9%, pode levar a uma acidificação do líquido folicular, bem como a fragmentação do DNA dos oócitos recuperados.

No segundo experimento (E2, Tabela 2), inicialmente, o resfriamento afetou os parâmetros oocitários quanto à taxa de recuperação e viabilidade das células do *cumulus* de oócitos bovinos. Contudo, a presença de SFB influenciou positivamente tanto na avaliação quantitativa (taxa de recuperação), quanto na viabilidade das células do *cumulus* 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. Santos *et al.* (2002), estudando os efeitos da solução salina e do PBS na morfologia de folículos

pré-antrais caprinos, observaram que a maior quantidade de componentes do PBS forneceu um maior aporte para sustentar a viabilidade folicular e oocitária. Além disso, os componentes do SFB combinados com o PBS podem ter permitido que uma maior quantidade de células do *cumulus* permanecesse viva após as 24 h de resfriamento, uma vez que baixas temperaturas, em um meio que oferece um bom aporte nutricional, impede que a membrana das células se desintegre (LIN *et al.*, 2011). Em soma, anteriormente também foi relatado o uso de suplementação energética em PBS para o armazenamento de ovários bovinos (IWATA *et al.*, 2005; adição de rafinose) e suínos (SAKAMOTO *et al.*, 2006; adição de glicose) onde se observou uma melhora na competência oocitária. Já em ovinos, a suplementação do PBS para o armazenamento (24 h a 4°C) dos ovários com melatonina, um composto antioxidante, permitiu a maturação e o desenvolvimento embrionário superior ao controle sem antioxidante (GOODARZI *et al.*, 2017). Portanto, no presente trabalho, o grupo PBS na presença de SFB foi escolhido para o quinto experimento.

Tabela 2 – 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	Qualidade oocitária		Viabilidade das células do <i>cumulus</i>
		Viáveis por avaliação morfológica	Viáveis por ensaio de ACB	
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	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
PBS/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

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

No terceiro experimento (E3, Tabela 3), o resfriamento afetou a taxa de recuperação, a qualidade oocitária quanto à morfologia e a viabilidade das células do *cumulus*. Com relação à presença de SFB, apenas a viabilidade das células do *cumulus* apresentou resultados positivos comparando ao DMEM sozinho, sendo a taxa de recuperação e avaliação morfológica influenciada negativamente pela presença de SFB. Esse resultado, apesar de contraditório, indica que é possível que mesmo circundando o oócito, as células do *cumulus* podem não estar viáveis. Isso mostra a importância de se realizar tanto a avaliação morfológica quanto de viabilidade das células para obter uma maior consistência dos resultados. Contudo, os dois parâmetros são importantes quando se trata de qualidade oocitária. Dessa forma, pode ser que a combinação de SFB e DMEM tenha favorecido a viabilidade das células do *cumulus*, devido à presença de fatores de crescimento, aminoácidos, vitaminas e outros nutrientes (PEREIRA *et al.*, 2015). Contudo, 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.

No quarto experimento (E4), o resfriamento afetou à taxa de recuperação de oócitos bovinos (Tabela 4). 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 células do *cumulus*, sendo superior ao grupo de ovários resfriados apenas em DPBS. Portanto, o grupo DPBS/SFB foi selecionado para o quinto experimento. A menor taxa de recuperação observada nos grupos resfriados pode ser explicada pelo longo período de resfriamento em baixas temperaturas, que pode ter influenciado na degeneração dos folículos, dificultando a recuperação dos oócitos no momento da aspiração (KIM *et al.*, 2006). Contudo, o bom resultado da viabilidade das células do *cumulus* no grupo suplementado com SFB pode estar relacionado à presença de uma maior quantidade de nutrientes e da alta capacidade de tamponamento do DPBS, que permite a manutenção de enzimas, hormônios e pH em faixas fisiológicas, permitindo assim o seu funcionamento normal e, conseqüentemente, aumentando a qualidade das células que circundam o oócito (LIN *et al.*, 2011; BOHLOOLI *et al.*, 2015).

No quinto experimento (E5, Tabela 5), os grupos que obtiveram melhores resultados nos experimentos anteriores [NaCl, PBS/SFB, DMEM, DPBS/SFB] e um grupo controle foram comparados entre si. Assim, 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 células do *cumulus*, onde os grupos de meios complexos [DMEM e DPBS/SFB] mostraram viabilidade superior aos grupos de meios simples [NaCl e PBS/SFB]. Além disso, os dois grupos com meios complexos mostraram uma maior proximidade com o grupo controle em relação a esse parâmetro. Anteriormente, Bohlooli *et al.* (2015) compararam o efeito do armazenamento 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)], e os resultados mostraram que a 4°C, a taxa de maturação alcançada foi de 81% em relação às outras temperaturas de transporte que variaram entre 73 e 74%. Nesse mesmo trabalho, CR1 e KSOM, que têm uma composição mais complexa, resultaram em uma melhor taxa de maturação (80,5% e 80,2%, respectivamente) que os demais meios (NaCl, PBS e CZB: 70-75%), tendo um efeito significativo também na taxa de ativação oocitária. Além disso, maiores taxas de embriões clivados foram encontradas utilizando os meios CR1 (43,6%), KSOM (43,2%) e CZB (41,1%). Dessa forma, é possível afirmar que meios complexos tem maior capacidade de manutenção dos gametas femininos durante o resfriamento.

Tabela 3 – 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	Qualidade oocitária		Viabilidade das células do <i>cumulus</i>
		Viáveis por avaliação morfológica	Viáveis por ensaio de ACB	
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	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
DMEM/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

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

Tabela 4 – 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	Qualidade oocitária		Viabilidade das células do <i>cumulus</i>
		Viáveis por avaliação morfológica	Viáveis por ensaio de ACB	
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	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
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

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

Tabela 5 – Avaliação quanti-qualitativa de oócitos imaturos bovinos derivados ovários resfriados por 24 h em diferentes meios e/ou soluções.

Grupo	Taxa de recuperação	Qualidade oocitária		Viabilidade das células do <i>cumulus</i>
		Viáveis por avaliação morfológica	Viáveis por ensaio de ACB	
Não resfriado	39,8 ± 6,8 (192/482) ^a	60,4 ± 4,8 (116/192) ^a	42,6 ± 8,8 (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

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

Além disso, a ausência de diferenças estatísticas na taxa de recuperação oocitária e na morfologia dos oócitos recuperados (Tabela 5) sugere que as características dos folículos permaneceram mesmo após 24 h de resfriamento na presença de meios apropriados (SANTOS et al., 2002; SILVA et al., 2003). Contudo, os meios complexos, suplementados ou não com SFB, que foram testados neste estudo, tiveram maior capacidade de manter a viabilidade das células do *cumulus*, mostrando que esse fator é de grande importância para a conservação de ovários resfriados por longos períodos de tempo. Adicionalmente, a presença de fontes energéticas como o piruvato no DMEM e tampões na composição do DPBS/SFB pode ter contribuído para esse resultado positivo (BOHLOOLI et al., 2015).

A presença do SFB em meio com alta capacidade de tamponamento permite um ambiente mais adequado para manutenção das características de qualidade dos ovários, uma vez que longos períodos de armazenamento fora do ambiente *in vivo* acidificam o líquido folicular devido a mudanças no metabolismo. Essa acidificação pode provocar degeneração do DNA e, conseqüentemente, perda da viabilidade oocitária (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 suas células utilizem melhor o oxigênio e a glicose presentes no meio, bem como mantenham as enzimas e hormônios em faixas fisiológicas, garantindo suas funções mesmo em condições de isquemia por períodos longos de tempo (SALEHI et al., 2004).

CONCLUSÃO

O resfriamento a 4°C e o meio de conservação de ovários bovinos por 24 h pode influenciar em fatores relacionados à qualidade de oócitos bovinos. A presença do SFB em meios com alta capacidade de tamponamento (PBS e DPBS) se mostrou benéfica para a viabilidade das células do *cumulus* e a taxa de recuperação oocitária. Contudo, o uso de uma suplementação proteica em um meio muito nutritivo (DMEM) ou muito simples (NaCl) não demonstrou ser essencial para manter a qualidade dos oócitos. Adicionalmente, pode-se afirmar que DMEM e o DPBS proporcionam um ambiente mais propício para o resfriamento por 24 h de ovários bovinos. Finalmente, são necessários estudos adicionais para avaliar os efeitos desse armazenamento em etapas posteriores à colheita de oócitos e durante o desenvolvimento embrionário.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq, processo no. 477710/2013-1).

REFERÊNCIAS

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*. África do Sul. v.45, p. 5-11, 2015.

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 Veterinaria*. São Paulo. v.31, p.7-11, 2015.

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. (Eds.). *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. São Paulo: Roca, p. 261-291, 2008.

GOODARZI, A.; SHAHNEH, A.Z.; KOHRAM, H.; SADEGHI, M.; FOULADI-NASHTA, A.; DAVACHI, N.D. Effect of melatonin supplementation in the long-term preservation of the sheep ovaries at different temperatures and subsequent *in vitro* embryo production. *Theriogenology*. New York, v. 106, p. 265-270, 2017.

HARA, H.; TAGIRI, M.; HIRABAYASHI, M.; HOCHI, S. Multiple aster formation is frequently observed in bovine oocytes retrieved from 1-day stored ovaries. *Zygote*. New York, v. 24, p. 115-120, 2016.

IWATA, H.; HAYASHI, T.; SATO, H.; KIMURA, K.; KUWAYAMA, T.; MONJI, Y. Modification of ovary stock solution with magnesium and raffinose improves the developmental competence of oocytes after long preservation. *Zygote*. New York, v. 13, p. 303-308, 2005.

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 parthenogenetic development of porcine follicular oocytes. *Journal of Reproduction and Development*. Tokyo. v.52, p.633-638, 2006.

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*. Taiwan. v.54, p.1-6, 2011.

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

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*. São Paulo. v.2, p.81-87, 2014.

- 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*. New York. v.67, p.1197-1203, 2002.
- OPIELA, J.; KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; LIPINSKI, D.; SŁOMSKI, R.; BZOWSKA, M.; RYN'SKA, 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*. New York. v.69, p.546-555, 2008.
- 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 and Animal Science*. São Paulo. v.52, p.158-166, 2015.
- 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*. Porto Alegre. v.38, p.341-349, 2010.
- SAKAMOTO, A.; IWATA, H.; SATO, H.; HAYASHI, T.; KUWAYAMA, T.; MONJI, Y. Effect of modification of ovary preservation solution by adding glucose on the maturation and development of pig oocytes after prolonged storage. *Journal of Reproduction and Development*. Tokyo, v. 52, p. 669-674, 2006.
- 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*. New York. v.48, p.245-253, 2004.
- SANTOS, M.V.O.; BORGES, A.A.; QUEIROZ NETA, L.B.; PEREIRA, A.F. Influence of the recovery method on the quanti-qualitative parameters of bovine oocytes. *ARS Veterinária*. São Paulo. v.32, p.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*. Londrina. v.38, p.1393-1402, 2017.
- SANTOS, R.R.; RODRIGUES, A.P.R.; MATOS, M.H.T.; SILVA, J.R.V.; CELESTINO, J.J.H.; MARTINS, F.S.; SARAIVA, M.V.A.; MELO, M.A.P.; FIGUEIREDO, J.R. Teste de toxicidade e criopreservação de folículos pré-antrais ovinos isolados utilizando glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido e propanodiol. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. São Paulo. v.43, p.250-255, 2006.
- 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*. São Paulo. v.39, p.254-259, 2002.
- SCHERNTHANER, W.; SCHMOLL, F.; BREM, G.; SCHELLANDER, K. Storing bovine ovaries for 24 hours between 15 and 21 C does not influence *in vitro* production of blastocysts. *Theriogenology*, New York, v.1, p.297, 1997.
- 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*. Santa Maria. v.33, p. 913-919, 2003.
- SHABANKAREH, H.K.; AZIMI, G.; TORKI, 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.
- 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*. Belo Horizonte. 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*. Belo Horizonte. v.14, p.476-481, 2017.
- 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*. New York. v.51, p.87-97, 2005.