

1 **INFLUÊNCIA DOS MEIOS DE ESTOCAGEM DURANTE O TRANSPORTE DE**
2 **OVÁRIOS BOVINOS A 4oC SOBRE A RECUPERAÇÃO E QUALIDADE**
3 **OOCITÁRIA**

4
5 *INFLUENCE OF STORAGE MEDIA DURING TRANSPORT OF BOVINE OVARIES AT 4oC*
6 *ON OOCYTE RECOVERY AND QUALITY*

7
8 **RESUMO**

9 O objetivo foi avaliar os efeitos de meios simples (NaCl a 0,9%, PBS) e complexos
10 (DMEM e DPBS) na presença e ausência de soro fetal bovino (SFB) durante o transporte por
11 24 h de ovários a 4oC sobre a recuperação e a qualidade oocitária bovina. Para tanto, cinco
12 experimentos (cinco repetições por experimento) foram realizados e ovários não resfriados
13 foram considerados como controle. Após a aspiração folicular, oócitos foram avaliados
14 quanto à qualidade por critérios morfológicos e pelo ensaio de azul cresil brilhante. Ainda,
15 células dos *cumulus* de oócitos viáveis foram avaliadas quanto à sua viabilidade pelo azul de
16 tripan. Todos os dados foram analisados pelos testes de Fisher ou qui-quadrado ($P < 0,05$). No
17 E1, NaCl permitiu uma maior taxa de recuperação em relação ao NaCl/SFB (46,0% vs.
18 39,6%), enquanto que os demais parâmetros não foram alterados. Já no E2, o SFB em PBS
19 influenciou positivamente a taxa de recuperação (41,2% vs. 32,8%) e a viabilidade celular
20 (46,3% vs. 41,7%), quando comparado ao PBS. No E3, o SFB em DMEM teve uma
21 influência negativa sobre a taxa de recuperação (39,9% vs. 40,7%) e avaliação morfológica
22 (59,0% vs. 73,1%). Contudo, a adição de SFB ao DMEM se mostrou benéfica à viabilidade
23 celular (42,0% vs. 34,5%). Em relação ao E4, a presença de SFB em DPBS influenciou
24 positivamente a viabilidade celular (50,7% vs. 47,0%). Já no E5, comparando os melhores
25 grupos [NaCl, PBS/SFB, DMEM, DPBS/SFB], a viabilidade celular mostrou uma maior

26 porcentagem em DMEM (54,0%) e DPBS (54,5%), quando comparada a NaCl (48,3%) e
27 PBS (50,1%). Em conclusão, a presença do SFB em meios com alta capacidade de
28 tamponamento (PBS e DPBS) pode se mostrar benéfica. Contudo, meios complexos (DMEM
29 e DPBS) resultam num ambiente mais propício para o resfriamento de ovários bovinos.

30 **PALAVRAS-CHAVE:** Produção *in vitro* de embriões. Resfriamento ovariano.
31 Suplementação proteica.

32

33 **ABSTRACT**

34 The aim was to evaluate the effects of simple (NaCl at 0.9%, PBS) and complexes
35 media (DMEM and DPBS) in the presence and absence of fetal bovine serum (FBS) during
36 24 h transport of ovaries at 4°C on bovine oocyte recovery and quality. Then, five
37 experiments (five replicates per experiment) were performed and uncooled ovaries were
38 considered as controls. After follicular aspiration, oocytes were evaluated for quality by
39 morphological criteria and by brilliant cresyl blue assay. Also, *cumulus* cells of viable oocytes
40 were evaluated for viability by tripan blue. All data were analyzed by Fisher's or chi-square
41 test ($P < 0.05$). In E1, NaCl allowed a higher rate of recovery compared to NaCl/FBS (46.0%
42 vs. 39.6%), while the other parameters were not altered. Already in E2, FBS in PBS positively
43 influenced recovery rate (41.2% vs. 32.8%) and cell viability (46.3% vs. 41.7%) when
44 compared to PBS. In E3, FBS in DMEM had a negative influence on the recovery rate (39.9%
45 vs. 40.7%) and morphological evaluation (59.0% vs. 73.1%). Nevertheless, the addition of
46 SFB to DMEM was shown to be beneficial to cell viability (42.0% vs. 34.5%). Regarding E4,
47 the presence of FBS in DPBS positively influenced cell viability (50.7% vs. 47.0%). Already
48 in E5, comparing the best groups (NaCl, PBS/FBS, DMEM, DPBS/FBS), cell viability
49 showed a higher percentage in DMEM (54.0%) and DPBS (54.5%) when compared to NaCl
50 (48.3%) and PBS (50.1%). In conclusion, the presence of FBS in media with high buffering

51 capacity (PBS and DPBS) may show to be beneficial. Nevertheless, complex media (DMEM
52 and DPBS) result in an environment more favorable to the cooling of bovine ovaries.

53 **KEY-WORDS:** *In vitro* embryo production. Ovarian cooling. Protein supplementation.

54

55

INTRODUÇÃO

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

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

71 Nesse contexto, torna-se importante o desenvolvimento de metodologias simples para
72 diminuir as perdas sofridas durante o tempo de transporte dos ovários. Assim, o resfriamento
73 de ovários inteiros em diferentes meios, suplementados ou não, surge como uma importante
74 alternativa para manter a qualidade dos ovários até o momento do processamento, mantendo
75 uma boa viabilidade oocitária (LUCCI *et al.*, 2004). Dentre os meios que podem ser

76 utilizados, existem àqueles de composição mais simples, como solução tampão fosfato (PBS)
77 e solução de cloreto de sódio a 0,9% (NaCl), bem como meios mais complexos e nutritivos,
78 como o meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) e solução tampão fosfato
79 modificada por Dulbecco (DPBS) (BOHLOOLI *et al.*, 2015). Alguns protocolos trazem ainda
80 como suplementação desses meios uma fonte proteica, como o soro fetal bovino (SFB), a fim
81 de promover o aumento da viabilidade folicular (RODRIGUES *et al.*, 2010). Contudo, há
82 poucas informações sobre os efeitos desse tipo de suplementação associada ao melhor meio
83 para o resfriamento. Portanto, objetivou-se avaliar os efeitos de meios simples e complexos na
84 presença e ausência de SFB durante o transporte por 24 h de ovários a 4oC sobre a
85 recuperação e a qualidade oocitária bovina.

86

87

MATERIAL E MÉTODOS

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

91 Cinco experimentos (cinco repetições por experimento) foram realizados usando
92 ovários de fêmeas bovinas adultas, mestiças e provenientes de abatedouro local. Em cada
93 experimento, ovários foram distribuídos aleatoriamente nos grupos não resfriados (controle) e
94 resfriados a 4oC por 24 h na presença ou ausência de 10% de SFB, perfazendo três grupos
95 para cada experimento. Assim, o experimento 1 (E1) consistiu na avaliação da solução de
96 NaCl a 0,9%; o segundo experimento (E2) na avaliação do PBS; o terceiro experimento (E3)
97 na análise do DMEM (Gibco 12800-017); o quarto experimento (E4) na avaliação do DPBS
98 (Gibco 14190) e, finalmente, o quinto experimento (E5) consistiu na comparação dos
99 melhores grupos observados nos experimentos anteriores.

100 Antes do transporte e estocagem por 24 h a 4oC, ovários foram recuperados e
101 selecionados macroscopicamente quanto à presença de folículos ovarianos e qualidade
102 morfológica (SANTOS *et al.*, 2016). Decorrido o período acima e dentro das condições
103 especificadas anteriormente, ovários foram submetidos à aspiração folicular (2–8 mm)
104 utilizando agulha 21G e seringa de 5,0 mL. Ovários do grupo controle foram processados
105 imediatamente após a colheita. O conteúdo recuperado da aspiração foi visualizado em
106 estereomicroscópio (aumento de 20x a 40x) e os oócitos foram classificados quanto à sua
107 qualidade inicialmente pela morfologia convencional, de acordo com o número de camadas de
108 células do *cumulus* e homogeneidade do citoplasma (GONÇALVES *et al.*, 2008): viáveis
109 (oócitos contendo uma ou mais camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo) e
110 não viáveis (oócitos parcialmente ou completamente desnudos com citoplasma homogêneo ou
111 heterogêneo) (GONÇALVES *et al.*, 2008).

112 Em seguida, a qualidade foi também avaliada pelo ensaio de azul cresil brilhante, ACB
113 (SANTOS *et al.*, 2016). Esse corante tem a capacidade de selecionar oócitos crescidos através
114 da atividade intracelular da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Essa enzima
115 tem alta atividade em oócitos em fase de crescimento e baixa atividade em oócitos crescidos.
116 A G6PDH tem a capacidade de reduzir o ACB de azul para incolor, fazendo com que oócitos
117 em fase de crescimento permaneçam sem coloração, enquanto que os oócitos crescidos
118 apresentaram uma coloração azul em seu citoplasma (SHABANKAREH *et al.*, 2014). Assim,
119 oócitos foram lavados e incubados em gotas de 300 µL de ACB (26 µM) por 60 min a
120 38,5°C. Decorrido o tempo, as estruturas foram avaliadas sob estereomicroscópio e àquelas
121 que apresentaram citoplasma azul foram classificadas como viáveis (ACB⁺), enquanto as que
122 não apresentaram coloração no citoplasma foram consideradas não viáveis (ACB⁻) (OPIELA
123 *et al.*, 2008).

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

132 Para análise estatística, todos os dados foram expressos como médias percentuais de
133 cinco repetições \pm erro padrão e analisados usando o software Graphpad InStat 3.06
134 (GraphPad Software Inc., La Jolla, EUA). Para os dados de taxa de recuperação oocitária
135 (oócitos recuperados/ folículos aspirados) e as taxas de oócitos viáveis (oócitos viáveis/total
136 de oócitos recuperados) por classificação morfológica e ensaio de ACB foram analisados pelo
137 teste de exato de Fisher. Já os dados de viabilidade das células do *cumulus* (células
138 viáveis/total de células contadas) foram analisados pelo teste do chi-quadrado. Diferenças
139 entre os grupos em cada experimento foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

140

141

RESULTADOS E DISCUSSÃO

142 No intuito de avaliar os parâmetros quantitativos e qualitativos de oócitos bovinos
143 transportados por 24 h a 4°C em meios simples (NaCl a 0,9% e PBS) e complexos (DMEM e
144 DPBS) na presença e ausência de 10% de SFB, um total de 532 ovários foi obtido de fêmeas
145 bovinas *post-mortem* e distribuídos entre os cinco experimentos: 121 (E1), 108 (E2), 71 (E3),
146 98 (E4) e 134 (E5). Em cada experimento, os ovários foram distribuídos aleatoriamente entre
147 os grupos experimentais.

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

156 Este resultado pode está relacionado com o longo período de armazenamento em um
157 meio pobre de nutrientes, que pode levar a uma acidificação do líquido folicular, provocando
158 a ruptura do folículo, bem como a uma fragmentação do DNA dos oócitos recuperados
159 (WONGSRIKEAO *et al.*, 2005). Além disso, a presença do SFB em NaCl, mesmo não
160 mostrando diferenças nos resultados de qualidade oocitária, mostrou-se prejudicial a
161 recuperação dos oócitos através da aspiração folicular. Contudo, esse resultado não indica que
162 o SFB não tenha uma ação positiva no resfriamento de ovários em NaCl, mas sim que esses
163 efeitos somente possam ser visualizados em análises mais específicas dos oócitos, como por
164 exemplo na taxa de maturação ou desenvolvimento embrionário.

165 No segundo experimento (E2, **Tabela 2**), inicialmente, o resfriamento afetou os
166 parâmetros oocitários quanto à taxa de recuperação e viabilidade das células do *cumulus* de
167 oócitos bovinos. Contudo, a presença de SFB influenciou positivamente tanto na avaliação
168 quantitativa (taxa de recuperação), quanto na viabilidade das células do *cumulus* dos oócitos
169 imaturos quando comparados ao grupo de ovários resfriados apenas em PBS. Já a qualidade
170 por morfologia e ensaio de ACB foi semelhante em todos os grupos. Santos *et al.* (2002),
171 estudando os efeitos da solução salina e do PBS na morfologia de folículos pré-antrais
172 caprinos, observaram que a composição mais rica do PBS forneceu fontes energéticas e

173 nutritivas que sustentaram a viabilidade folicular e oocitária. Além disso, os componentes do
174 SFB combinados com o PBS podem ter permitido que uma maior quantidade de células do
175 *cumulus* permanecesse viva após as 24 h de resfriamento, uma vez que baixas temperaturas,
176 em um meio que oferece um bom aporte nutricional, impede que a membrana das células se
177 desintegre (LIN *et al.*, 2011). Portanto, o grupo PBS na presença de SFB foi escolhido para o
178 quinto experimento.

179 No terceiro experimento (E3, **Tabela 3**), o resfriamento afetou a taxa de recuperação, a
180 qualidade oocitária quanto à morfologia e a viabilidade das células do *cumulus*. Com relação
181 à presença de SFB, apenas a viabilidade das células do *cumulus* apresentou resultados
182 positivos comparando ao DMEM na ausência de SFB, sendo a taxa de recuperação e
183 avaliação morfológica influenciada negativamente pela presença de SFB. Isso pode ser
184 explicado pela presença de fatores de crescimento, aminoácidos, vitaminas e outros nutrientes
185 presentes tanto no soro quanto no DMEM, que combinados permitiram um ambiente
186 favorável para as células que circundam os oócitos (PEREIRA *et al.*, 2015). Já o ensaio de
187 ACB foi semelhante entre os grupos avaliados ($P>0,05$). Assim, o grupo DMEM apresentou-
188 se melhor em dois parâmetros e, portanto, foi selecionado para o quinto experimento.

189 No quarto experimento (E4), o resfriamento afetou à taxa de recuperação de oócitos
190 imaturos bovinos (**Tabela 4**). DPBS/SFB e DPBS foram semelhantes quanto à taxa de
191 recuperação e qualidade avaliada por morfologia e ensaio de ACB. Contudo, a presença do
192 SFB influenciou positivamente a viabilidade das células do *cumulus*, sendo superior ao grupo
193 de ovários resfriados apenas em DPBS. Portanto, o grupo DPBS/SFB foi selecionado para o
194 quinto experimento. A menor taxa de recuperação observada nos grupos resfriados pode ser
195 explicada pelo longo período de resfriamento em baixas temperaturas, que pode ter
196 influenciado na degeneração dos folículos, dificultando a recuperação dos oócitos no
197 momento da aspiração (KIM *et al.*, 2006). Contudo, o bom resultado da viabilidade das

198 células do *cumulus* no grupo suplementado com SFB pode está relacionado à presença de uma
199 maior quantidade de nutrientes e da alta capacidade de tamponamento do DPBS, que permite
200 a manutenção de enzimas, hormônios e pH em faixas fisiológicas, permitindo assim o seu
201 funcionamento normal e, conseqüentemente, aumentando a qualidade das células que
202 circundam o oócito (LIN *et al.*, 2011; BOHLOOLI *et al.*, 2015).

203 No quinto experimento (E5, **Tabela 5**), os grupos que obtiveram melhores resultados
204 nos experimentos anteriores [NaCl, PBS/SFB, DMEM, DPBS/SFB] e um grupo controle
205 foram comparados entre si. Assim, todos os meios foram semelhantes em relação à taxa de
206 recuperação, morfologia e ensaio de ACB ($P>0,05$). Contudo, o resfriamento afetou a
207 viabilidade das células do *cumulus*, onde os grupos de meios complexos [DMEM e
208 DPBS/SFB] mostraram viabilidade superior aos grupos de meios simples [NaCl e PBS/SFB].
209 Além disso, os dois grupos com meios complexos mostraram uma maior proximidade com o
210 grupo controle em relação a esse parâmetro. Anteriormente, Bohlooli *et al.* (2015)
211 compararam o efeito do resfriamento em diferentes temperaturas (4oC, 25oC e 38oC) e meios
212 [solução salina normal; PBS; meio de otimização simples K (KSOM); meio Chatot-Ziomek-
213 Bavister (CZB) e meio Charles Rosenkrans (CR1)], e os resultaram mostraram que a 4oC, a
214 taxa de maturação alcançada foi de 81% em relação às outras temperaturas de transporte.
215 Nesse mesmo trabalho, CR1 e o KSOM, que têm uma composição mais complexa, resultaram
216 em uma melhor taxa de maturação (80,5% e 80,2%, respectivamente) que os demais meios,
217 tendo um efeito significativo também na taxa de ativação oocitária. Além disso, maiores taxas
218 de embriões clivados foram encontradas utilizando os meios CR1 (43,6%), KSOM (43,2%) e
219 CZB (41,1%). Dessa forma, é possível afirmar que meios complexos tem maior capacidade de
220 manutenção dos gametas femininos durante o resfriamento.

221 Além disso, a ausência de diferenças estatísticas na taxa de recuperação oocitária e na
222 morfologia dos oócitos recuperados (**Tabela 5**) sugerem que as características dos folículos

223 permaneceram mesmo após 24 h de resfriamento na presença de meios apropriados
224 (SANTOS *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2003). Contudo, os meios complexos, suplementados ou
225 não com SFB, que foram testados neste estudo, tiveram maior capacidade de manter a
226 viabilidade das células do *cumulus*, mostrando que esse fator é de grande importância para a
227 conservação de ovários resfriados por longos períodos de tempo. Adicionalmente, a presença
228 de fontes energéticas como o piruvato e tampões na composição do DMEM e do DPBS/SFB
229 pode ter contribuído para esse resultado positivo (BOHLOOLI *et al.*, 2015).

230 A presença do SFB em meio com alta capacidade de tamponamento permite um
231 ambiente mais adequado para manutenção das características de qualidade dos ovários, uma
232 vez que longos períodos de armazenamento fora do ambiente *in vivo* acidificam o líquido
233 folicular devido a mudanças no metabolismo. Essa acidificação pode provocar degeneração
234 do DNA e, conseqüentemente, perda da viabilidade oocitária (WONGSRIKEAO *et al.*, 2005).
235 Assim, meios que têm a capacidade de manter o pH estável oferecem um melhor ambiente
236 para o armazenamento de ovários, permitindo assim que as suas células utilizem melhor o
237 oxigênio e a glicose presentes no meio, bem como mantenham as enzimas e hormônios em
238 faixas fisiológicas, garantindo suas funções mesmo em condições de isquemia por períodos
239 longos de tempo (SALEHI *et al.*, 2004).

240 Este é o primeiro estudo a avaliar os efeitos de uma suplementação proteica em meios
241 simples e complexos no resfriamento de ovários inteiros bovinos por longo período de tempo
242 e mostrou que meios e suplementação apropriada contribuem para que a falta de suporte
243 vascular não acarrete em mudanças drásticas de metabolismo que prejudicam parâmetros de
244 qualidade oocitária (MAO *et al.*, 2002). Contudo, em situações de necessidade, meios simples
245 podem ser usados, pois apesar de menos eficientes conseguem conservar a qualidade oocitária
246 e a taxa de recuperação.

247

248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272

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 meios complexos como o DMEM e o DPBS proporcionam um ambiente mais propício para o resfriamento por 24 h de ovários bovinos.

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.;

273 FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. (Eds.). Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal.
274 São Paulo: Roca, p. 261-291, 2008.
275
276 KIM, H.J.; CHOI, S.H.; SON, D.S.; CHO, S.R.; CHOE, C.Y.; KIM, Y.K.; HAN, M.H.; RYU,
277 I.; KIM, I.C.; KIM, I.; IM, K.S.; NAGAI, T. Effect of exposure duration of ovaries and
278 oocytes at ambient temperature on parthenogenetic development of porcine follicular oocytes.
279 *Journal of Reproduction and Development*. Tokyo. v.52, p.633-638, 2006.
280
281 LIN, Y.; TSAI, H. B.; LIAO, M. H.; CHEN, M. C. Effects of preservation media on *in vitro*
282 maturation of porcine oocytes. *Chinese Journal of Physiology*. Taiwan. v.54, p.1-6, 2011.
283
284 LUCCI, C.M.; KACINSKIS, M.A.; RUMPF, R.; BÁO, S.N. Effects of lowered temperatures
285 and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles.
286 *Theriogenology*. New York. v.61, p.461-472, 2004.
287
288 MACHADO, E.S.; CÉZAR, J.M.; OLIVEIRA, L.; TEIXEIRA, L.S.; LIMA, T.A. Técnicas de
289 melhoramento genético em bovinos para o aumento na produção de leite. *Interfaces*
290 *Científicas – Saúde e Ambiente*. São Paulo. v.2, p.81-87, 2014.
291
292 MAO, J.; WU, G.; SMITH, M.F.; MCCAULEY, T.C.; CANTLEY, T.C.; PRATHER, R.S.;
293 DIDION , B.A.; DAY, B.N. Effects of culture medium, serum type, and various
294 concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development
295 and antrum formation *in vitro*. *Biology of Reproduction*. New York. v.67 p.1197-1203, 2002.
296

297 OPIELA, J.; KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; LIPINSKI, D.; SŁOMSKI, R.; BZOWSKA,
298 M.; RYN´SKA, B. Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenas in
299 immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental
300 competence following IVP in cattle. *Theriogenology*. New York. v.69, p.546-555, 2008.
301

302 PEREIRA, L.M.C.; BERSANO, P.R.O.; LOPES, M.D. Influência da temperatura de
303 transporte de ovários na maturação *in vitro* de oócitos caninos coletados em diferentes
304 estágios do ciclo estral. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. São
305 Paulo. v.52, p.158-166, 2015.
306

307 RODRIGUES, G.Q.; BRUNO, J.B.; FAUSTINO, L.R.; SILVA, C. M. G.; FIGUEIREDO, J.
308 R. Suplementação proteica no meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. *Acta Scientiae*
309 *Veterinariae*. Porto Alegre. v.38, p.341-349, 2010.
310

311 SALEHI, P.; SPRATLIN, J.; CHONG, T.F.; CHURCHILL, T.A. Beneficial effects of
312 supplemental buffer and substrate on energy metabolism during small bowel storage.
313 *Cryobiology*. New York. v.48, p.245-253, 2004.
314

315 SANTOS, M.V.O. ; BORGES, A.A.; QUEIROZ NETA, L.B.; PEREIRA, A.F. Influence of
316 the recovery method on the quanti-qualitative parameters of bovine oocytes. *ARS Veterinária*.
317 São Paulo. v.32, p.105-109, 2016.
318

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

322 SANTOS, R.R.; RODRIGUES, A.P.R.; MATOS, M.H.T.; SILVA, J.R.V.; CELESTINO,
323 J.J.H.; MARTINS, F.S.; SARAIVA, M.V.A.; MELO, M.A.P.; FIGUEIREDO, J.R. Teste de
324 toxicidade e criopreservação de folículos pré-antrais ovinos isolados utilizando glicerol,
325 etilenoglicol, dimetilsulfóxido e propanodiol. *Brazilian Journal of Veterinary Research and*
326 *Animal Science*. São Paulo. v.43, p.250-255, 2006.

327

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

332

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

337

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

341

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

345

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

349

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

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371 **Tabela 1** – Avaliação quanti-qualitativa de oócitos imaturos bovinos derivados de ovários
 372 resfriados por 24 h em NaCl na presença e ausência de soro fetal bovino (SFB).

Grupos	Taxa de recuperação (n)	Qualidade oocitária		Viabilidade das células do <i>cumulus</i>
		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	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

373 ^{a,b}: diferem na mesma coluna (P<0,05).

374

375 **Tabela 2** – Avaliação quanti-qualitativa de oócitos imaturos bovinos derivados de ovários
 376 resfriados por 24 h em PBS na presença e ausência de soro fetal bovino (SFB).

Grupos	Taxa de recuperação (n)	Qualidade oocitária		Viabilidade das células do <i>cumulus</i>
		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	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

377 ^{a,b}: diferem na mesma coluna (P<0,05).

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

Grupos	Taxa de recuperação (n)	Qualidade oocitária		Viabilidade das células do <i>cumulus</i>
		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	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

380 ^{a,b}: diferem na mesma coluna (P<0,05).

381

382 **Tabela 4** – Avaliação quanti-qualitativa de oócitos imaturos bovinos derivados de ovários
 383 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 <i>cumulus</i>
		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	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

384 ^{a,b}: diferem na mesma coluna (P<0,05).

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

Grupo	Taxa de recuperação (<i>n</i>)	Qualidade oocitária		Viabilidade das células do <i>cumulus</i>
		Avaliação morfológica (<i>n</i>)	Ensaio de ACB (<i>n</i>)	
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) ^{ac}	67,5 ± 4,6 (106/157) ^a	42,3 ± 2,4 (47/111) ^a	54,5 ± 2,8 (2199/4031) ^b

387 ^{a,b,c}: diferem na mesma coluna (P<0,05).

388