



ARTIGOS COMPLETOS	1234
RESUMOS	1267



ARTIGOS COMPLETOS

AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO MEIÓTICA DE oócitos bovinos SUPLEMENTADOS com GLICOPROTEÍNA 1 DE OVIDUTO (OVGP1) durante as dez e seis horas finais da maturação <i>in vitro</i>	1235
AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO MEIÓTICA NA MATURAÇÃO IN VITRO DE OÓCITOS BOVINOS SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES DOSAGENS DE GLICOPROTEÍNA 1 DE OVIDUTO (OVGP1)	1244
AVALIAÇÃO DO TEOR LIPÍDICO NA MATURAÇÃO IN VITRO DE OÓCITOS BOVINOS SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES DOSAGENS DE GLICOPROTEÍNA 1 DE OVIDUTO (OVGP1)	1255

AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO MEIÓTICA DE OÓCITOS BOVINOS SUPLEMENTADOS COM GLICOPROTEÍNA 1 DE OVIDUTO (OVGP1) DURANTE AS DEZ E SEIS HORAS FINAIS DA MATURAÇÃO *IN VITRO*

Jaqueline Aparecida Andrelo de Lima, Ananda Silva Coimbra, Lorryne Kerolyn dos Santos Teles, Maria Rosa Martins Dos Santos, Sheila Merlo Garcia Firetti

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP. E-mail: jaqueandrelo@gmail.com

RESUMO

A maturação *in vitro* (MIV) é uma das fases mais importantes da PIVE, e vários fatores podem afetar os índices de maturação. Dessa maneira, essa pesquisa buscou avaliar a qualidade de maturação *in vitro* de oócitos suplementados com glicoproteína 1 de oviduto (OVGP 1) em diferentes tempos, mediante progressão nuclear. Os tratamentos avaliados foram, T1: MIV + 10% SFB, T2: T1: MIV + 4% BSA, T3: T1: MIV + 4%BSA + OVGP às 14hpm e T4: MIV + 4%BSA+ OVGP às 18hpm. Os tratamentos foram avaliados em 3 experimentos, nos quais utilizou-se diferentes dosagens de OVGP1: 1ng, 10ng e 100ng. Os folículos foram aspirados e selecionados os oócitos de Grau I e II. Foram realizadas cinco repetições, (n=90) sendo 15 oócitos avaliados antes da maturação e os demais submetidos à maturação *in vitro*. Para análise da progressão nuclear, os oócitos foram corados com Hoechst e avaliados em microscópio de epifluorescência. Os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico Qui-quadrado (X^2), ao nível de significância de 5%. No experimento 01, suplementação com 1ng OVGP, observou-se melhores resultados para o tratamento suplementado apenas com BSA. No experimento 2, com dosagem de 10ng OVGP, os tratamentos T3 e T4 (suplementados com a proteína) apresentaram melhores taxas de progressão meiótica. No experimento 3, o tratamento 1 (suplementação com SFB) apresentou melhores taxas. Nesse caso, o excesso de proteína, pode ter inviabilizado a progressão meiótica. Conclui-se que a suplementação com OVGP na dosagem de 10ng/ml apresentou melhores taxas de progressão meiótica, independente do tempo de suplementação, sendo a dosagem mais recomendada.

Palavras-chave: Produção *in vitro*. Progressão Meiótica. Hoechst. Proteína.

EVALUATION OF MEIOTIC PROGRESSION OF BOVINE OOCYTES SUPPLEMENTED WITH OVIDUTE GLYCOPROTEIN 1 (OVGP1) DURING THE FINAL TEN AND SIX HOURS OF *IN VITRO* MATURATION.

ABSTRACT

In vitro maturation (IVM) is one of the most important phases of IVP, and several factors can affect maturation rates. Thus, this research sought to evaluate the quality of *in vitro* maturation of oocytes supplemented with oviduct glycoprotein 1 (OVGP 1) at different times, through nuclear progression. The treatments evaluated were, T1: IVM + 10% FBS, T2: T1: IVM + 4% BSA, T3: T1: IVM + 4%BSA + OVGP at 14hpm and T4: IVM + 4%BSA+ OVGP at 18hpm. The treatments were evaluated in 3 experiments, in which different doses of OVGP1 were used: 1ng, 10ng and 100ng. The follicles were aspirated, and Grade I and II oocytes were selected. Five replications were performed (n=90) with 15 oocytes evaluated before maturation and the others submitted to *in vitro* maturation. For analysis of nuclear progression, oocytes were stained with Hoechst and evaluated under an epifluorescence microscope. Data were submitted to the non-parametric Chi-square (X^2) test, at a significance level of 5%. In experiment 01, supplementation with 1ng OVGP, better results were observed for the treatment supplemented only with BSA. In experiment 2, with a dosage of 10ng OVGP, treatments T3 and T4 (supplemented with protein) showed better rates of meiotic progression. In experiment 3, treatment 1 (supplementation with FBS) showed better rates. In this case, excess protein may have made meiotic progression unfeasible. It is concluded that supplementation with OVGP at a dosage of 10ng/ml showed better rates of meiotic progression, regardless of the time of supplementation, being the most recommended dosage.

Keywords: *In vitro* production. Meiotic Progression. Hoechst. Protein.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o Brasil vem passando por um crescimento significativo no segmento das biotecnologias. Com um amplo conhecimento sobre a obtenção de embriões *in vivo* e *in vitro*, o país passou a dominar a aspiração folicular e a PIVE, ganhando uma importante posição no mercado de embriões bovinos, o que o levou a ser considerado o principal exportador de carne bovina e o maior rebanho comercial do mundo (LOIOLA *et al.*, 2014).

Na produção *in vitro* de embriões, as fontes de suplementos mais utilizadas para a maturação dos oócitos, são o soro fetal bovino (SFB) e a albumina sérica bovina (BSA) (MINGOTI, 2000). No entanto, outros meios de cultivo têm sido pesquisados com o objetivo de melhorar os índices de maturação, e, o desenvolvimento embrionário. Com isso, muitas pesquisas têm sido realizadas testando a adição de proteínas para a produção de embriões, destacando a glicoproteína 1 de oviduto (OVGP1) (ALGARRA, *et al.*, 2016).

A OVGP1 é uma glicoproteína que possui um elevado peso molecular, e atualmente sabe-se que ela é excretada apenas pelas células epiteliais não ciliadas da trompa de Falópio (NATRAJ, *et al.*, 2002; BHATT, *et al.*, 2004). Primeiramente, ela foi determinada como uma proteína secretada por indução do estrogênio no oviduto, devido a isso, ela é caracterizada como uma glicoproteína que é dependente do estrogênio e específica do oviduto. A OVGP1 apresenta um importante papel para a técnica de produção de embriões *in vitro*, havendo a necessidade de mais pesquisas para mais resultados quanto a sua utilização e substituição aos meios de cultivos utilizados para a técnica da produção de embriões *in vitro* (ALGARRA, *et al.*, 2016).

A maturação nuclear se refere à habilidade de retomar e completar a meiose mediante uma complexa sequência de eventos nucleares (FISSORE *et al.*, 2002), caracterizados pela progressão da divisão meiótica. Durante esse processo observa-se a transição do estágio nuclear de vesícula germinativa (VG) ao de metáfase II (MII), passando por mudanças que preparam o oócito para ser fecundado e estar apto para se desenvolver como embrião (DODE; ADONA; RODOVALHO, 2000). Diante disso, a progressão nuclear é um parâmetro de suma importância para a determinação de oócitos viáveis para a produção de embriões bovinos, no qual a suplementação de OVGP1 resultará em efeitos positivos na qualidade de maturação oocitária *in vitro*.

No Brasil, o crescimento da PIVE permitiu sua aplicação em larga escala, e com isso a exportação desse modelo para vários países. Mas com a grande extensão territorial e distância percorrida de onde os animais ficam até os laboratórios da PIVE, muitas vezes, isso tem limitado o crescimento da produção *in vitro* comercial e científico, principalmente pelo tempo gasto com o transporte e pelas condições (LOIOLA *et al.*, 2014).

Mesmo através de muitos esforços para que haja uma melhoria na produção *in vitro* de embriões PIVE para fins comerciais ou científicos, ainda é relativamente baixa sua eficiência, pois, apenas de 35 a 40% dos oócitos maturados (MIV) fecundados (FIV) e cultivados *in vitro* (CIV) vão se desenvolver. Essas baixas taxas de desenvolvimento podem ser determinadas por fatores ambientais ou pelas próprias características do sistema de PIVE de embriões, que vão atuar na maturação, fecundação e no cultivo, e pode ser pela remoção do oócito do folículo, o que causa a perda da interação morfológica, hormonal e molecular entre células foliculares e oócitos. (GOTTARDI; MINGOTI, 2009).

Sendo assim, essa pesquisa buscou avaliar a qualidade da maturação *in vitro* de oócitos bovinos, suplementados com glicoproteína 1 de oviduto (OVGP1), em diferentes dosagens (1ng/ml, 10ng/ml e 100 ng/ml) e diferentes tempos (6 e 10 h finais da MIV), através da progressão meiótica e assim determinar a dosagem e o tempo que indicará maior viabilidade para o procedimento de maturação *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido no laboratório de PIVE, da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE – Campus II – Presidente Prudente – SP. Para sua realização foram utilizados ovários de fêmeas bovinas sem raça definida, provenientes do abatedouro Gold Carnes, no município de Regente-Feijó – SP.

Os ovários foram transportados para o laboratório em garrafa térmica contendo solução salina a 0,9% de NaCl, em temperatura de 37°C, por um período máximo de uma hora.

No laboratório, os ovários foram lavados com solução salina e mantidos em banho-mar.ia a 37°C até serem aspirados. Para a aspiração folicular os ovários foram limpos com gaze estéril, e os folículos visíveis serão aspirados com auxílio de seringas de 20mL com extremidade de agulha 18G. O líquido folicular

aspirado permaneceu nos tubos de ensaio, em banho-maria a 37°C, em posição vertical por cerca de 15 minutos, para que a solução decante.

Após a aspiração o sedimento, contendo os oócitos, foi depositado em placa de petri marcada, para posteriormente fazer a procura dos oócitos, em lupa esteromicroscópica (SMZ 745T, Nikon, Tóquio, Japão), com aumento de 7,5x.

Os oócitos recuperados foram classificados de acordo com o aspecto morfológico dos complexo cúmulo-oócito (COC's), segundo Lonergan *et al.* (2003), em 5 grupos de qualidade, onde Grau I = células do cumulus compacto presente, contendo mais de três camadas de células; Grau II = células do cumulus compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares; Grau III = células do cumulus presente, com apenas uma camada de célula; Desnudo = ausência de camada de células do cumulus e Atrésicos = células do cumulus em regressão celular.

Foram utilizados oócitos de grau I e II, foram realizadas cinco repetição com n= 90 , do total de oócitos recuperados, 15 oócitos foram avaliados antes da maturação e 75 foram submetidos à maturação *in vitro* onde cada grupos experimentais teve n=15.

Após a aspiração, seleção e classificação dos oócitos em grau I, II, os oócitos foram divididos em três experimentos com cinco repetições cada. Os tratamentos avaliados foram meio de maturação suplementados com: 10% de soro fetal bovino - SFB (T1 ou controle), 4% albumina sérica bovina - BSA (T2 ou controle) , 4%BSA+OVGP às 14hpm (T3) e 4%BSA+OVGP às 18hpm (T4) nas respectivas dosagens até completar as 24h de maturação, ou seja, durante as 10 e 6 horas finais da MIV . Para a avaliação dos tratamentos, foram realizados ainda 3 experimentos, nos quais foram utilizadas diferentes dosagens de OVGP1, sendo elas: 1ng de OVGP1 (experimentos 1), 10ng de OVGP1 (experimentos 2), e 100ng de OVGP1 (experimentos 3).

Para cada repetição, foram utilizados no máximo 15 oócitos, que foram depositados em gotas de 90 µL contendo meio base de maturação TCM-199 (M-3769, Sigma Co., St. Louis, EUA), 2,2 mg/mL de solução de bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de piruvato de sódio, 50 µg/mL de sulfato de gentamicina suplementado com 1 µg/mL de FSH (Folltropin®-V Bioniche, Inc., Canadá), 5 µg / mL de LH (Lutropin® Bioniche, Inc., Canadá), acrescidos de SFB ou BSA e então cobertas com óleo mineral (M8410, Sigma Co., St. Louis, EUA), em placa de petri (35x10 mm), a qual foi preparada uma hora antes e mantidos à temperatura de 38°C em atmosfera gasosa de 5% de CO₂ em ar e com máxima umidade para os meios de maturação (10%SFB e 4%BSA) estabilizar, sendo que após as 14 e 18 hpm (10 h e 6 h finais da MIV) foi retirado 0,75ul do meio de maturação (4% BSA) dos experimentos 1, 2 e 3 nos tratamento três e quatro e adicionado a OVGP1 nas concentração 1ng, 10ng e 100ng de acordo com cada grupo experimental e mantidas na estufa até completar as vinte quatro horas de maturação.

Para a avaliação da progressão meiótica foi realizada a coloração do núcleo dos oócitos imaturos e maturados. Primeiramente foi feita a remoção das células do cumulus. Os oócitos foram depositados em microtubos contendo 0,2% de hialuronidase (H3884, Sigma Co., St. Louis, EUA) e desnudados mecanicamente com auxílio de um agitador vortex, por 5 minutos. Posteriormente, os oócitos foram fixados em 500µL de 4% de paraformaldehyde (P6148, Sigma Co., St. Louis, EUA) por 30 minutos à temperatura ambiente, em placa de quatro poços.

Após isso, foram lavados três vezes em solução de bloqueio (SB - PBS com 1mg/ml de albumina sérica bovina – A6003, Sigma Co., St. Louis, EUA), e então permeabilizados por 15 minutos à 38°C em SB acrescida de 0,1% de 10 µL de Triton (X-100, Sigma Co., St. Louis, EUA), nessa etapa também foi possível deixá-los em temperatura de 4°C, no máximo por 7 dias, para posterior continuação (overnight). Os oócitos foram lavados três vezes novamente na SB, e corados com 10 µg/mL de Hoechst (33342, Sigma Co., St. Louis, EUA) em PBS por 10 minutos. Após este tempo, foram lavados por mais três vezes em PBS.

Após o processo de coloração, os oócitos foram transferidos para lâminas de vidro, em gotas 10 µL de glicerol, recobertas com laminulas e vedadas com esmalte. As lâminas foram levadas para análise no laboratório da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), em Presidente Prudente-SP, situado na Rodovia Raposo Tavares, km 561, onde foi analisado a qualidade da maturação dos grupos experimentais, através da fase nuclear que os oócitos se encontram.

Os oócitos foram avaliados quanto à fase nuclear, em microscópio de epifluorescência (Olympus - IX-51, objetiva de 40x, excitação 330-385nm e e missão 420-490nm para o Hoechst). Esta fase dos oócitos

maturados foram classificadas em: vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) ou degenerado/anucleado (D).

A classificação dos estados de maturação nuclear foi avaliada segundo Hewitt, Watson e England (1997), por graus variados de condensação dos cromossomos. Como, vesícula germinativa, quebra da vesícula germinativa, metáfase I, metáfase II, degenerados, posteriormente os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico Qui-quadrado (X^2), ao nível de significância de 5%, utilizando o programa computacional Statistical Analysis System for Windows (SAS Inst., Inc., Cary, NC).

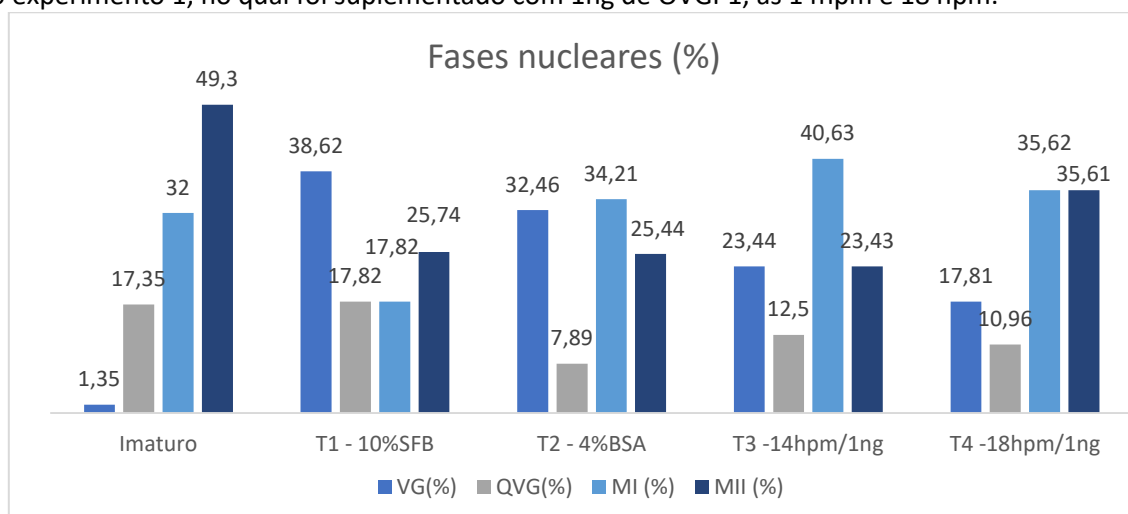
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram recuperados 995 oócitos, no qual foram distribuídos nos três experimentos, nos respectivos tratamentos como demonstrado nas tabelas a baixo e as porcentagens correspondentes representadas nos gráficos subsequentes.

Tabela 1. Frequência absoluta (n) de oócitos recuperados e avaliados de acordo com o experimento 1, no qual foi suplementado com 1ng de OVGP1, sendo os tratamentos imaturos; T1 – 10%SFB; T2 - 4%BSA; T3 - 14hpm; T4 - 18hpm mediante a coloração de Hoechst para avaliação da progressão meiótica.

Tratamento	VG	QVG	MI	MII	Total
Imaturo	4	51	94	145	294
T1 - 10%SFB	39	18	18	26	101
T2 - 4%BSA	37	9	39	29	114
T3 -14hpm/1ng	15	8	26	15	64
T4 -18hpm/1ng	13	8	26	26	73
Total	108	94	203	241	646

Gráfico 1. Frequência percentual (%) das fases nucleares dos oócitos recuperados e avaliados de acordo com o experimento 1, no qual foi suplementado com 1ng de OVGP1, as 14hpm e 18 hpm.

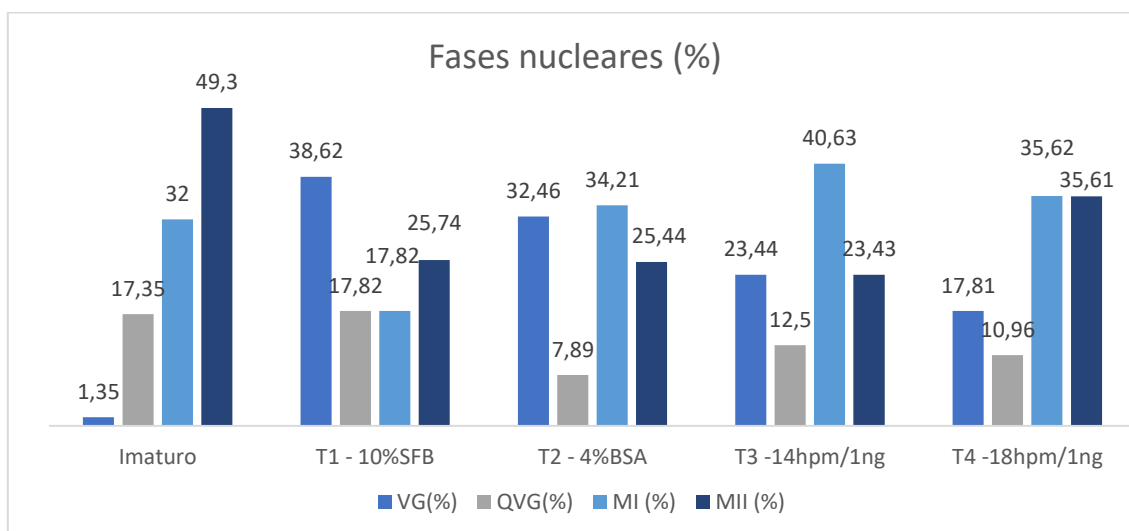


Os oócitos suplementados nas 10 (14hpm) e 6 (18hpm) horas finais da MIV com 1ng de OVGP1 a análise estatística indica que quando comparado os tratamento 10%SFB vs 4% BSA ($p=0,169$), houve diferença significativa onde o tratamento 4%BSA apresentou maior frequência numérica de oócitos em MII, 10% SFB vs 14hpm/1ng ($p=0,0108$), houve diferença significativa onde o tratamento 10% SFB apresentou maior frequência numérica de oócitos em MII, 10% SFB vs 18hpm/1ng ($p=0,0027$), houve diferença significativa porém ambos tratamentos apresentou a mesma frequência numérica de oócitos em MII, já nos tratamentos 4% BSA vs 14hpm/1ng ($p= 0,04611$), 4% BSA vs 18hpm/1ng ($p=0,1314$) e 14hpm/1ng vs 18hpm/1ng ($p= 0,4728$) não apresentaram diferença significativa quando submetidos ao teste não-paramétrico Qui-quadrado (X^2), ao nível de significância de 5%.

Tabela 2. Frequência absoluta (n) de oócitos recuperados e avaliados de acordo com o experimento 2, no qual foi suplementado com 10ng de OVGP1, sendo os tratamentos imaturos; T1 – 10%SFB; T2 – 4%BSA; T3 –14hpm; T4 - 18hpm mediante a coloração de Hoechst para avaliação da progressão meiótica.

Tratamento	VG	QVG	MI	MII	Total
Imaturo	4	51	94	145	294
T1 - 10%SFB	39	18	18	26	101
T2 - 4%BSA	37	9	39	29	114
T3 - 14hpm/10ng	12	24	23	39	98
T4 -18hpm/10ng	17	12	20	34	83
Total	109	114	194	273	690

Gráfico 2.– Frequência percentual (%) das fases nucleares dos oócitos recuperados e avaliados de acordo com o experimento 2, no qual foi suplementados com 10ng de OVGP1, as 14hpm e 18 hpm.

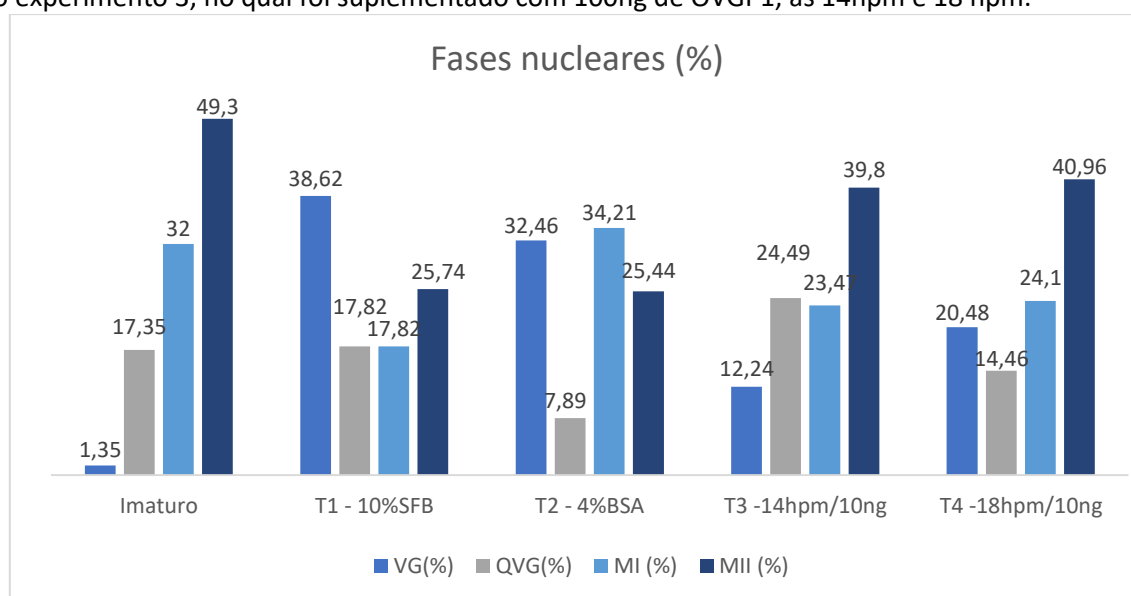


Para os oócitos suplementados nas 10 (14hpm) e 6 (18hpm) horas finais da MIV com 10ng de OVGP1 a análise estatística indica que quando comparado os tratamento 10%SFB vs 4% BSA ($p=0,169$), houve diferença significativa onde o tratamento 4%BSA apresentou maior frequência numérica de oócitos em MII, 10% SFB vs 14hpm/10ng ($p=0,0004$) houve diferença significativa onde o tratamento 14hpm/10ng apresentou maior frequência numérica de oócitos em MII, 10% SFB vs 18hpm/10ng ($p=0,0251$), houve diferença significativa onde o tratamento 18hpm/10ng apresentou maior frequência numérica de oócitos em MII, 4% BSA vs 14hpm/10ng ($p < .0001$), houve diferença significativa onde o tratamento 14hpm/10ng apresentou maior frequência numérica de oócitos em MII, 4% BSA vs 18hpm/10ng ($p=0,0212$) houve diferença significativa onde o tratamento 18hpm/10ng apresentou maior frequência numérica de oócitos em MII, já nos tratamentos e 14hpm/10ng vs 18hpm/10ng ($p= 0,2407$) não apresentaram diferença significativa quando submetidos ao teste não-paramétrico Qui-quadrado (χ^2), ao nível de significância de 5%.

Tabela 3. Frequência absoluta (n) de oócitos recuperados e avaliados de acordo com o experimento 3, no qual foi suplementado com 100ng de OVGP1, sendo os tratamentos imaturos; T1 – 10%SFB; T2 – 4%BSA; T3 -14hpm; T4 - 18hpm mediante a coloração de Hoechst para avaliação da progressão meiótica.

Tratamento	VG	QVG	MI	MII	Total
Imaturo	4	51	94	145	294
T1 - 10%SFB	39	18	18	26	101
T2 - 4%BSA	37	9	39	29	114
T3 - 14hpm/100ng	26	14	31	28	99
T4 - 18hpm/100ng	16	7	30	16	69
Total	122	99	212	244	677

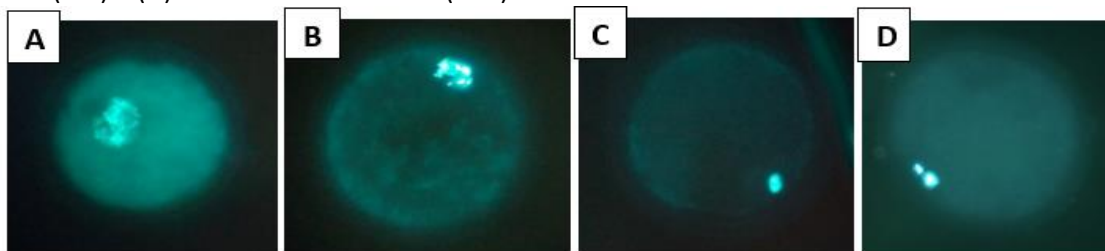
Gráfico 3. Frequência percentual (%) das fases nucleares dos oócitos recuperados e avaliados de acordo com o experimento 3, no qual foi suplementado com 100ng de OVGP1, as 14hpm e 18 hpm.



Os oócitos que foram suplementados nas 10 (14hpm) e 6 (18hpm) horas finais da MIV com 100ng de OVGP1 a análise estatística indica que quando comparado os tratamento 10%SFB vs 4% BSA ($p=0,169$), houve diferença significativa onde o tratamento 4%BSA apresentou maior frequência numérica de oócitos em MII, 10% SFB vs 18hpm/100ng ($p=0,0025$), houve diferença significativa onde o tratamento 10% SFB apresentou maior frequência numérica de oócitos em MII, já nos tratamentos 10% SFB vs 14hpm/100ng ($p=0,0857$), 4% BSA vs 14hpm/100ng ($p=0,4077$), 4% BSA vs 18hpm/100ng ($p=0,4590$) e 14hpm/100ng vs 18hpm/100ng ($p=0,4346$) não apresentaram diferença significativa quando submetidos ao teste não-paramétrico Qui-quadrado (X^2), ao nível de significância de 5%.

A Figura 1 representa os oócitos bovinos corados com a sonda fluorescente Hoechst (33342, Sigma Co., St. Louis, EUA), técnica utilizada para a identificação e classificação dos estágios de maturação nuclear, por graus variados de condensação dos cromossomos.

Figura 1. Oócitos bovinos em diferentes fases nucleares da progressão meiótica corados com Hoechst 33342, observados em microscópio de epifluorescência sob excitação 330-385nm e emissão 420-490nm: (A) oócito em vesícula germinativa (VG); (B) oócito em quebra de vesícula germinativa (QVG); (C) oócito em metáfase I (M I) e (D) oócito em metáfase II (M II).



Uma das etapas mais desafiadoras da produção *in vitro* é a maturação pois é neste período que se adquire a competência oocitária, e para que isso ocorra é necessário que se crie um ambiente favorável o mais próximo possível do fisiológico (DECANINE,2013).

Vários fatores podem influenciar no processo de maturação (GUEMRA *et al.*, 2014) e um deles pode estar relacionado ao tempo de suplementação, observando a falta de dados na literatura sobre tempo de suplementação ideal, o momento que será acrescido meios de maturação para potencializar essa etapa o que fez necessário a presente pesquisa pois ela mostra que a suplementação com OVGP1 em diferentes tempo sendo eles 14hpm e 18hpm (10 ou 6 horas finais da MIV) não interferiu no processo de maturação, o que pode ter contribuído foi a variação de dosagem da proteína e não a hora na qual ela foi adicionado ao meio de maturação.

Palhares (2020), utilizando suplementação de fulerol 50nM (MF50) por 36 horas, notou que nas seis horas iniciais da maturação *in vitro* os oócitos mantiveram-se em vesícula germinativa e em quebra de vesícula germinativa, porém ao serem avaliados 18 horas após o início da maturação *in vitro* notou se a presença de oócitos em metáfase I e II.

Ao estudar os possíveis efeitos das proteínas BSA-V, PVP e FCS durante a maturação oocitária Ali e Sirard (2002) avaliaram os seguintes tempo 6 h para GVBD e 18 h para o começo da MII e determinar o quantos as mesma estimulam ou atrasa a maturação nuclear e concluíram que BSA-V atrasou GVBD e MII nos respectivos tempo onde segundo os autores os oócitos bovinos são sensíveis a BSA-V o que reafirma que ao retirar o BSA e acrescentar 10ng de OVGP1 contribuiu para uma melhor maturação nuclear e não o tempo após a sua adição mais a dosagem utilizada.

Estudos realizados por Santos *et al.* (2002) com oócitos de bubalinos trabalhando com os seguintes tempos 14 a 17h, 20 a 22h, 23 a 25h, 26 a 28h, 29h e 32h suplementados com, TCM 199 com 10% de Soro Fetal Bovino, meio base e células da granulosa, 10 UI de gonadotrofina coriônica equina e 10 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG), e Meio base, 10 UI de eCG, 10UI de hCG e 1 µg de 17b-estradiol /ml, observou que meios que apresenta maior efetivação possibilita uma melhor taxa de retomada da meiose em menor tempo, entretanto períodos longos de cultivos pode apresentar grandes índice de oócitos degenerados.

Conclui-se que a suplementação com OVGP na dosagem de 10ng/ml apresentou melhores taxas de progressão meiótica, independente do tempo de suplementação (10 e 6 horas finais da MIV), sendo a dosagem mais recomendada.

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, pelo apoio financeiro através do Programa Especial de Iniciação Científica (PEIC).

À Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio – APTA.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão de bolsa de estudo de iniciação científica (IC), sob processo n° 202/09778-8.

REFERÊNCIA

ALGARRA, B. *et al.* The C-terminal region of OVGP1 remodels the zona pelúcida and modifies fertility parameters. **ScientificReports**. Murcia: Espanha, 2016. Disponível em:

<https://www.nature.com/articles/srep32556>. Acesso em: 11 Mar. 2020.
<https://doi.org/10.1038/srep32556>

ALI, A. SIRARD, M. A. Effect of the Absence or Presence of Various Protein Supplements on Further Development of Bovine Oocytes During *In vitro* Maturation, **Biology of Reproduction**. v. 66, p. 901-905, abr. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.4.901> . Acesso em : 17 Fev. de 2020

BHATT, P. *et al.* Fertilization, embryonic development and oviductal environment: role of estrogen induced oviductal glycoprotein. **Indian Journal Experimental Biology**. v 42, p.1043-55. Índia, 2004. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/8141143_Fertilization_embryonic_development_and_oviductal_environment_Role_of_estrogen_induced_oviductal_glycoprotein. Acesso em: 24 jan. 2020.

DODE, M. A. N.; ADONA, P. R.; RODOVALHO, N. C. M. Retenção da meiose de oócitos bovinos em líquido folicular de folículos de vários tamanhos. **Arq Faculdade de Veterinária UFRGS**. Porto Alegre, v. 28, p. 241, 2000.

FISSORE *et al.* Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. **Reproduction**, Amherst, v. 124, p. 745-754, 2002. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/124/6/745.xml>. Acesso em: 13 Mar. de 2020. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1240745>

GOTTARDI, F. P. MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.33, n.2, p.82-94, abr./jun. 2009. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/pag82-94.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2020.

GUEMRA, S.; SILVA SANTO, E.; ZANIN, R. *et al.* Effect of temporary meiosis block during prematuration of bovine cumulus-oocyte complexes on pregnancy rates in a commercial setting for *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v.81, p.982-7, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.026>

HEWITT, D. A. WATSON, P. F. ENGLAND, G. C. Nuclear staining and culture

Requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. **Theriogenology**. v.49, p.1083-1128, 1998
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00058-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00058-2) .

LOIOLA, V. M. *et al.* Validação de um programa de produção *in vitro* de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. **Ciência Animal Brasileira**. v. 15, n. 1, p. 93-101, mar. 2014. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/23327>. Acesso em: 11 Jul. de 2020.
<https://doi.org/10.5216/cab.v15i1.23327>

LONERGAN, P. *et al.* Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 38, p. 259-267, 2003. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/10638213_Oocyte_and_Embryo_Quality_Effect_of_Origin_Culture_Conditions_and_Gene_Expression_Patterns. Acesso em: 23 Out. 2020. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00437.x>

MINGOTI, G. Z. **Maturação oocitária associada à esteroidogênese: papel do soro sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteróides**. 141 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17134/tde-07112001-095400/pt-br.php>. Acesso em: 05 set. 2020.

NATRAJ, U. *et al.* Overexpression of Monkey Oviductal Protein: Purification and Characterization of Recombinant Protein and Its Antibodies. Society for the Study of Reproduction. **Biology of Reproduction**. v. 67, p.1897-1906. Mumbai: Índia, 2002. Disponível em:

<http://www.bioone.org.ez259.periodicos.capes.gov.br/doi/pdf/10.1095/biolreprod67.6.1897>. Acesso em: 11 Out.2020. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.6.1897>

PALHARES, R. C. F.T; **Dinâmica da maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos cultivados *in vitro* em meio suplementado com fulerol**. 61f. Dissertações de Mestrado, Escola de Veterinária – UFMG, Belo Horizonte, 2020. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/35522>. Acesso em: 28 jul. 2021

SANTOS, S. S. D. *et al.* Cinética da maturação nuclear *in vitro* de oócitos bubalinos. Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, v. 39, n. 5, p. 266-270, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-9596200200050000> . Acesso em: 15 ago. 2021

SAS Institute Inc. 2019. SAS/STAT® 15.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO MEIÓTICA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES DOSAGENS DE GLICOPROTEÍNA 1 DE OVIDUTO (OVGP1)

Ananda Silva Coimbra, Lorryne Kerolyn dos Santos Teles, Maria Rosa Martins dos Santos, Jaqueline Aparecida Andrelo de Lima, Sheila Merlo Garcia Firetti

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP. E-mail: ananda.sc.31@hotmail.com

RESUMO

O desenvolvimento de alternativas para otimizar a produtividade do rebanho é o desafio atual dos pesquisadores. A produção *in vitro* de embriões surge como uma principal ferramenta que necessita de gametas viáveis e de qualidade para que se tenha sucesso. Diante disso, esta proposta teve como objetivo estudar a qualidade de maturação *in vitro* de oócitos com diferentes dosagens de suplementação da glicoproteína 1 de oviduto (OVGP1), através da progressão nuclear, de oócitos oriundos de ovários de fêmeas de abatedouro, e determinar a dosagem de suplementação que indica maior viabilidade para o procedimento de maturação nuclear *in vitro*. As suplementações utilizadas para a maturação *in vitro* dos oócitos foram: soro fetal bovino - 10%SFB (T1 ou controle), albumina sérica bovina - 4%BSA (T2), 4%BSA + 1 ng/ml de OVGP1 (T3), 4%BSA + 10 ng/ml de OVGP1 (T4) e 4%BSA + 100 ng/ml de OVGP1 (T5), compondo os grupos experimentais. As suplementações foram avaliadas ainda em diferentes tempos de maturação, as 14hpm (experimento 1) e as 18hpm (experimento 2). Foram realizadas cinco repetições, com (n=90) oócitos recuperados para cada repetição, sendo 15 oócitos avaliados antes da maturação e os demais submetidos à maturação *in vitro* de acordo com os grupos experimentais, totalizando 75 oócitos maturados por repetição. Para análise da progressão nuclear, os oócitos foram corados com HOECHST (33342, Sigma Co., St. Louis, EUA) e avaliados individualmente em microscópio de epifluorescência. Os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico Qui-quadrado (X^2), ao nível de significância de 5%, utilizando o programa computacional Statistical Analysis System for Windows (SAS Inst., Inc., Cary, NC). No experimento 1 observou-se melhor porcentagem de oócitos maturados no T4 - 4%BSA+10ng (39,80% MII; p=0,0169) quando comparado aos demais grupos. No experimento 2, melhores resultados foram obtidos nos tratamentos T3 - 1ng OVGP1 (35,62% MII; p=0,0251) e T4 - 10 ng OVGP1 (40,96% MII, p=0,0212). Conclui-se que adição de OVGP nas dosagens 1ng e 10 ng, de acordo com o período de suplementação proporciona melhor progressão meiótica nuclear dos oócitos maturados *in vitro*, possibilitando a obtenção de maiores porcentagens de oócitos com núcleo no estágio de metáfase II (M II).

Palavras-chave: Produção *in vitro*. Progressão Meiótica. Hoechst. Proteína.

EVALUATION OF MEIOTIC PROGRESSION *IN VITRO* MATURATION OF BOVINE OOCYTES SUPPLEMENTED WITH DIFFERENT DOSAGES OF OVIDUTE GLYCOPROTEIN 1 (OVGP1)

ABSTRACT

The development of alternatives to optimize herd productivity is the current challenge for researchers. The *in vitro* production of embryos appears as a main tool that needs viable and quality gametes to be successful. Therefore, this proposal aimed to study the quality of *in vitro* maturation of oocytes with different dosages of oviduct glycoprotein 1 (OVGP1) supplementation, through nuclear progression, of oocytes from ovaries of slaughterhouse females, and to determine the dosage of supplementation that indicates greater viability for the *in vitro* nuclear maturation procedure. The supplements used for *in vitro* maturation of oocytes were: fetal bovine serum - 10%SFB (T1 or control), bovine serum albumin - 4%BSA (T2), 4%BSA + 1 ng/ml of OVGP1 (T3), 4%BSA + 10 ng/ml of OVGP1 (T4) and 4%BSA + 100 ng/ml of OVGP1 (T5), composing the experimental groups. Thus, 4%BSA+OVGP 1, 10 or 100ng/ml supplements were evaluated at different maturation times, 14hpm (experiment 1) and 18hpm (experiment 2). Five repetitions were performed, with (n=90) oocytes recovered for each repetition, with 15 oocytes evaluated before maturation and the others submitted to *in vitro* maturation according to the experimental groups, totaling 75 oocytes matured per repetition. For analysis of nuclear progression, oocytes were stained with HOECHST

(33342, Sigma Co., St. Louis, USA) and individually evaluated under an epifluorescence microscope. Data were submitted to the non-parametric Chi-square (X^2) test, at a significance level of 5%, using the computer program Statistical Analysis System for Windows (SAS Inst., Inc., Cary, NC). In experiment 2, better results were obtained in treatments T3 - 1ng OVGP1 (35.62% MII; $p=0.0251$) and T4 - 10 ng OVGP1 (40.96% MII, $p=0.0212$). It is concluded that the addition of OVGP at doses of 1ng and 10 ng, according to the period of supplementation, provides better nuclear meiotic progression of *in vitro* matured oocytes, making it possible to obtain higher percentages of oocytes with a nucleus in the metaphase II stage (M II).

Keywords: *In vitro* production. Meiotic Progression. Hoechst. Protein.

INTRODUÇÃO

No Brasil, o crescimento da PIVE permitiu sua aplicação em larga escala, e com isso a exportação desse modelo para vários países. Mas com a grande extensão territorial e distância percorrida de onde os animais ficam até os laboratórios da PIVE, muitas vezes, isso tem limitado o crescimento da produção *in vitro* comercial e científico, principalmente pelo tempo gasto com o transporte e pelas condições (LOIOLA et al., 2014).

Mesmo através de muitos esforços para que haja uma melhoria na produção *in vitro* de embriões PIVE para fins comerciais ou científicos, ainda é relativamente baixa sua eficiência, pois, apenas de 35 a 40% dos oócitos maturados (MIV) fecundados (FIV) e cultivados *in vitro* (CIV) vão se desenvolver. Essas baixas taxas de desenvolvimento podem ser determinadas por fatores ambientais ou pelas próprias características do sistema de PIVE de embriões, que vão atuar na maturação, fecundação e no cultivo, e também pode ser pela remoção do oócito do folículo, o que causa a perda da interação morfológica, hormonal e molecular entre células foliculares e oócitos. (GOTTARDI; MINGOTI, 2009).

Na PIVE, após a aspiração e seleção, os oócitos são submetidos à MIV que segundo Penitente Filho et al. (2015), a fase de maturação nuclear compreende a progressão do estágio diplóteno prófase I até o período da metáfase II, processo que leva cerca de 18 a 24 horas em atmosfera controlada, contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2002).

Esta é uma técnica que consiste na obtenção, sob condições artificiais, da maturação de oócitos, (GONÇALVES et al., 2007), permitindo que os oócitos, independentemente da fase da onda folicular, que se encontram em PI, retomem a meiose e atinjam a fase de MII, e adquiram a competência para serem fecundados e, assim, iniciem a embriogênese (SMITZ et al., 2004).

Portanto, essa técnica tem o potencial de resgatar uma grande quantidade de oócitos imaturos ainda no ovário e cultivá-los *in vitro* até a maturação (GILCHRIST; LANE; THOMPSON, 2008). No entanto, os mecanismos celulares envolvidos na competência do oócito ainda não são bem descritos e necessitam de mais estudos e pesquisas.

Na PIV são utilizados meios de cultura denominados como definidos, semi- definidos e indefinidos. Os meios de cultura indefinidos são aqueles meios compostos por substâncias que seja de material biológico, e os meios classificados como definidos são aqueles isentos de soro ou de qualquer outro composto biológico (GORDON, 1994 apud MOZZAQUATRO et al., 2004). Na produção *in vitro* de embriões, os meios de cultura ou as fontes de suplemento mais utilizadas são o soro fetal bovino (SFB) ou a albumina sérica bovina (BSA) (MINGOTI, 2000).

O soro fetal bovino (SFB) é o suplemento mais utilizado nos meios de cultura, porém, pensando em um outro suplemento proteico semi-definido, a albumina sérica bovina (BSA) tem sido muito usada na substituição do soro. No cultivo *in vitro* (CIV), Dell Collado et al. (2014) apresentam os resultados de Gomez et al. (2008) que em sua pesquisa, encontraram taxas muito satisfatórias de blastocistos e de criotolerância quando a BSA é empregada nos meios de cultura. Mas quando ela é utilizada na maturação *in vitro* (MIV), há estudos que mostram que seu uso resulta em um decréscimo nas taxas de maturação e nas taxas de desenvolvimento embrionário (ALL; SIRARD, 2002; KORHONEN et al. 2010), enquanto outros estudos já mostram um aumento nas taxas de maturação e desenvolvimento embrionário (RUSELL et al. 2006).

O BSA possui fatores que viabilizam o desenvolvimento embrionário. Ele é uma fonte de proteínas muito empregada em meios de cultivo, pois garante uma proteção ao embrião em cultivo contra eventuais elementos tóxicos encontrados nos meios de cultura, graças a sua propriedade de ligação (FLOOD; SHIRLEY, 1991). Além disso, segundo Mehta e Kiessling (1990) o BSA é capaz de equilibrar o pH, e é capaz também, de fazer com que as células não se preguem em superfícies de plásticos e também de vidro, devido possuir uma propriedade surfactante (PINYOPUMINTR; BAVISTER, 1994; TETZNER, 2007).

Outros meios de cultivo têm sido pesquisados com o objetivo de melhorar os índices de maturação, e o desenvolvimento embrionário. Com isso, muitas pesquisas têm sido realizadas testando a adição de proteínas para a produção de embriões, destacando a glicoproteína 1 de oviduto (OVGP1). Primeiramente, ela foi caracterizada como uma proteína secretada por indução do estrogênio no oviduto, devido a isso ela é caracterizada como uma glicoproteína que é dependente do estrogênio e específica do oviduto. No entanto, pesquisas recentes têm mostrado que a OVGP1 também contribui nos processos que ocorrem para a capacitação do espermatozoide, fertilização, e ao desenvolvimento embrionário inicial (BUHI, 2002; CHOUDHARY, 2017).

Um estudo levantado por Algarra et al., (2016) mostrou que a atividade biológica da OVGP1 ocorre de maneira distinta entre as espécies. Em sua pesquisa, é apresentado que a OVGP1 auxilia o processo da capacitação e fertilização espermática em fêmeas bovinas (KING ; KILIAN, 1994); intensifica a união entre o espermatozoide (YANG et al., 2015) e aumenta os índices de penetração da zona em hamster (BOATMAN; MAGNOMI, 1995) e em humano (O'DAY BOWMAN et al., 1996); promove um bloqueio à polispermia ao melhorar a clivagem e a formação do embrião caprino (PRADEEP et al., 2011); e em suínos, ela colabora ao controlar a polispermia (AVILÉS; GUTIÉRREZ-ADÁN; COY; 2010), torna eficiente a fertilização *in vitro* (MCCAULEY et al., 2003) e promove um aumento na taxa de blastocisto (KOUBA et al., 2000). Diante dos estudos apresentados, a OVGP1 apresenta um importante papel para a técnica de produção de embriões *in vitro*, havendo a necessidade de mais pesquisas para mais resultados quanto a sua utilização e substituição aos meios de cultivos utilizados para a técnica da produção de embriões em laboratório (ALGARRA et al., 2016).

No início da maturação nuclear ocorre condensação gradual da cromatina, desaparecimento do nucléolo e desintegração da membrana celular, processo denominado quebra de vesícula germinativa (QVG) (KUBELKA et al., 1998). Posteriormente, os cromossomos se encontram mais condensados e dispostos no plano central do eixo metafásico, caracterizando o estágio de metáfase I (MI), evoluindo para MII quando ocorre compactação dos cromossomos e extrusão do primeiro corpúsculo polar (HEWITT; WATSON; ENGLAND, 1997).

A visualização dos cromossomos dos oócitos e determinação dos estádios nucleares de maturação também podem ser utilizados como parâmetros para avaliação da maturação e podem ser examinados sob microscopia ótica com contraste de fase (LI et al., 2002), ou por fluorescência (MIYARA et al., 2003). Os oócitos que são capazes de retomar a meiose apresentam dois grupos de cromossomos bem condensados, com corpúsculo polar evidente (SUN et al., 2004). Ainda que a maturação oocitária envolva alterações nucleares, na prática a avaliação da maturação do oócito utilizada na rotina da FIV é a observação da expansão das células do cumulus e da emissão do primeiro corpúsculo polar, que indicam que a M II foi atingida (GOUDET et al., 1997).

Portanto, a maturação nuclear é caracterizada pelo oócito em estágio de M II, e para as técnicas de reprodução assistida, esse é um importante parâmetro para avaliar o potencial de maturação oocitária, e dessa maneira, aumentar a eficiência na seleção de oócitos viáveis para a produção de embriões bovinos.

Este trabalho tem como objetivo verificar a influência das diferentes dosagens de suplementação proteica (OVGP1) sobre a qualidade da maturação *in vitro* de oócitos bovinos, avaliar a competência oocitária, mediante maturação nuclear e progressão meiótica de oócitos bovinos maturados *in vitro* e comparar a progressão meiótica antes e após a maturação *in vitro* em oócitos bovinos suplementados com diferentes doses de OVGP1.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido no laboratório de PIVE, da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE – Campus II em Presidente Prudente - SP. Para sua realização foram utilizados ovários de fêmeas bovinas sem raça definida, provenientes do abatedouro Gold Carnes, no município de Regente-Feijó – SP. Os ovários foram transportados para o laboratório em garrafa térmica contendo solução salina a 0,9% de NaCl, em temperatura de 37°C, por um período máximo de uma hora.

No laboratório, os ovários foram lavados com solução salina e mantidos em banho-maria a 37°C até serem aspirados. Para a aspiração folicular os ovários foram limpos com gaze estéril, e os folículos visíveis foram aspirados com auxílio de seringas de 20mL com extremidade de agulha 18G. O líquido folicular aspirado permanecerá nos tubos de ensaio, em banho-maria a 37°C, em posição vertical por cerca de 15 minutos, para que a solução decante.

Os oócitos recuperados foram classificados de acordo com o aspecto morfológico dos complexo cúmulo-oócito (COC`s), segundo Lonergan *et al.* (2003), em 5 grupos de qualidade, onde Grau I = células do cumulus compacto presente, contendo mais de três camadas de células; Grau II = células do cumulus compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares; Grau III = células do cumulus presente, com apenas uma camada de célula; Desnudo = ausência de camada de células do cumulus e Atrésicos = células do cumulus em regressão celular. Desnudo = ausência de camada de células do cumulus e Atrésicos = células do cumulus em regressão celular.

Em cada repetição, do total de oócitos recuperados, 15 oócitos foram avaliados antes da maturação e os demais foram submetidos à maturação *in vitro* de acordo com os grupos experimentais.

Após a aspiração, seleção e classificação dos oócitos em grau I, II, os oócitos foram divididos em cinco grupos experimentais e dois experimentos um para cada tempo, às 14 horas após maturação (hpm) e 18 horas após maturação (hpm), com cinco repetições. Os tratamentos utilizados foram um meio de maturação, acrescido de diferentes fontes de proteína SFB e BSA e OVGP1, onde: Tratamento 1 (controle) = meio de maturação com 10%SFB (soro fetal bovino), Tratamento 2 (controle 2) = meio de maturação com 4%BSA (albumina sérica bovina), Tratamento 3 = meio de maturação com 4%BSA + OVGP1 com dosagem de 1 ng/ml, Tratamento 4 = meio de maturação com 4%BSA + OVGP1 com dosagem de 10ng/ml e Tratamento 5 = meio de maturação com 4%BSA + OVGP1 com dosagem de 100ng/ml.

Para cada repetição, grupos de no máximo 15 oócitos, foram depositados em gotas de 90 µL contendo meio base de maturação TCM-199 (M-3769, Sigma Co., St. Louis, EUA), 2,2 mg/mL de solução de bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de piruvato de sódio, 50 µg/mL de sulfato de gentamicina suplementado com 1 µg/mL de FSH (Folltropin®-V Bioniche, Inc., Canadá), 5 µg / mL de LH (Lutropin® Bioniche, Inc., Canadá), acrescidos de SFB ou BSA ou BSA + OVGP1 (de acordo com o grupo experimental) que foram acrescido ao meio às 14 e 18hpm, onde os grupos suplementados às 14hpm receberam a proteína nas 8 horas finais de maturação e o grupo às 18hpm receberam nas 4 horas finais e então cobertas com óleo mineral (M8410, Sigma Co., St. Louis, EUA), em placa de petri (35x10 mm), mantidos à temperatura de 38,5°C em atmosfera gasosa de 5% de CO₂ em ar e com máxima umidade, por um período de 22 horas à 24 horas.

Para a avaliação da progressão meiótica foi realizada a coloração do núcleo dos oócitos imaturos e maturados com Hoechst (33342, Sigma Co., St. Louis, EUA) em PBS.

Feito o processo de coloração, os oócitos foram transferidos para lâminas de vidro, para análise no laboratório da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), em Presidente Prudente-SP, onde foi analisado a qualidade da maturação dos grupos experimentais, através da fase nuclear que os oócitos se encontram.

Os oócitos foram avaliados quanto à fase nuclear, em microscópio de epifluorescência (Olympus - IX-51, objetiva de 40x, excitação 330-385nm e emissão 420-490nm para o Hoechst). Esta fase dos oócitos maduros pode ser classificada em: vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) ou degenerado/anucleado (D).

A classificação dos estados de maturação nuclear foi avaliada segundo Hewitt, Watson e England (1997), por graus variados de condensação dos cromossomos, como segue:

-Vesícula germinativa (VG, estágio dictiato da prófase I): Presença de núcleo vesicular, envelope nuclear e cromossomos apresentando-se pouco condensados;

-Quebra da Vesícula Germinativa (QVG): Cromossomos apresentavam pequeno grau de condensação com dispersa distribuição, porém ainda com núcleo de aspecto vesicular, mas sem a presença do envelope nuclear;

-Metáfase I (MI): Cromossomos apresentavam grau mais avançado de condensação, não sendo possível a visualização individual dos cromossomos;

-Metáfase II (MII): Cromossomos metafásicos na periferia do ooplasma e aparecimento do primeiro corpúsculo polar;

-Degenerados/Não passíveis de determinação (D/NI): Oócitos cujo estágio de desenvolvimento nuclear não era passível de determinação ou não apresentavam cromatina evidente.

Os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico Qui-quadrado (χ^2), ao nível de significância de 5%, utilizando o programa computacional Statistical Analysis System for Windows (SAS Inst., Inc., Cary, NC).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a avaliação da progressão meiótica, foram utilizados 300 ovários, dos quais selecionou-se 995 oócitos totais, foram realizados dois experimentos, sendo eles, experimento 1 (um) os tratamentos 4%BSA+1ng/ml14hpm, 4%BSA+10ng/ml14hpm e 4%BSA+100ng/ml14hpm, que foram suplementados por um período de 14hpm, tendo 10 horas de suplementação proteica, e o experimento 2 (dois) os tratamentos 4%BSA+1ng/ml18hpm, 4%BSA+10ng/ml18hpm e 4%BSA+100ng/ml18hpm, que foram suplementados por um período de 18hpm, tendo 6 horas de suplementação proteica, deste modo foram analisados 5 tratamentos para cada experimento.

Para a avaliação da progressão meiótica às 14hpm, foram recuperados e avaliados 770 oócitos totais, com 133 oócitos pertencentes à VG, 124 à QVG, 282 à MI, 231 à MII, que foram suplementados as 14hpm. Para a avaliação da progressão meiótica às 18hpm, foram recuperados e avaliados 770 oócitos totais, com 126 oócitos pertencentes à VG, 105 à QVG, 227 à MI, 276 à MII, que foram suplementados as 18hpm.

A Figura 1 representa os oócitos bovinos corados com a sonda fluorescente Hoechst (33342, Sigma Co., St. Louis, EUA), técnica utilizada para a identificação e classificação dos estágios de maturação nuclear, por graus variados de condensação dos cromossomos.

Figura 1. Oócitos bovinos em diferentes fases nucleares da progressão meiótica corados com Hoechst 33342, observados em microscópio de epifluorescência sob excitação 330-385nm e emissão 420-490nm: (A) oócito em vesícula germinativa (VG); (B) oócito em quebra de vesícula germinativa (QVG); (C) oócito em metáfase I (M I) e (D) oócito em metáfase II (M II).

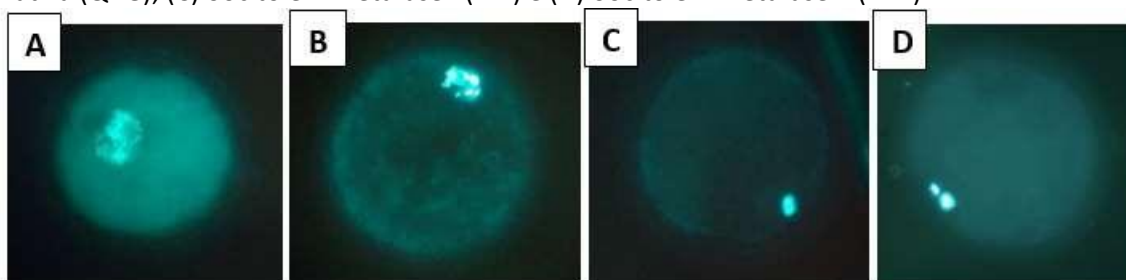


Tabela 1. Frequência percentual (%) das fases nucleares da progressão meiótica dos oócitos suplementados com diferentes dosagens de OVG1, após o período de 14 horas de maturação *in vitro* (14hpm) experimento 01.

Tratamento	VG (%)	QVG (%)	MI (%)	MII (%)	TOTAL (%)
T1 - 10%SFB (controle)	38,61	17,82	17,82	25,74c	100
T2 - 4%BSA (controle)	32,46	7,89	34,21	25,44b	100
T3 - 4%BSA+1ng 14hpm	23,44	12,50	40,63	23,44b	100
T4 - 4%BSA+10ng 14hpm	12,24	24,49	23,47	39,80a	100
T5 - 4%BSA+100ng 14hpm	26,26	14,14	31,31	28,28bc	100

*Teste qui-quadrado.

Tabela 2. Frequência percentual (%) das fases nucleares da progressão meiótica dos oócitos suplementados com diferentes dosagens de OVG1, após o período de 18 horas de maturação *in vitro* (18hpm) - Experimento 02.

Tratamento	VG (%)	QVG (%)	MI (%)	MII (%)	TOTAL (%)
T1 - 10%SFB	38,61	17,82	17,82	25,74b	100
T2 - 4%BSA	32,46	7,89	34,21	25,44b	100
T3 - 4%BSA+1ng 18hpm	17,81	10,96	35,62	35,62a	100
T4 - 4%BSA+10ng 18hpm	20,48	14,46	24,10	40,96a	100
T5 - 4%BSA+100ng 18hpm	23,19	10,14	43,48	23,19b	100

*Teste qui-quadrado.

A técnica de maturação *in vitro* permite que os oócitos retomem a maturação nuclear, já que ela se encontra em estado de quiescência para o recrutamento dos folículos dominantes, deste modo a MIV faz com que os oócitos atinjam a metáfase II *in vitro* e adquiram a competência para serem fecundados e, para conseqüentemente iniciar-se a embriogênese (GILCHRIST et al., 2008). Com este trabalho foi possível verificar que ocorreu a maturação nuclear de modo que a competência oocitária foi adquirida de acordo com as fases, onde quando os oócitos ainda imaturos tiveram 49,32% na fase de QVG, enquanto os maturados tiveram 24,96% na fase de metáfase II, em contrapartida quando imaturos apenas 1,36% dos oócitos estavam em fase de metáfase II.

Os tratamentos com diferentes dosagens de OVGP1, foram avaliados aos pares e as diferenças significativas entre os grupos avaliados do experimento 1 (14hpm), de acordo com a tabela 01, foram: T1 - 10% SFB vs T2 - 4%BSA ($p=0,0169$), T1 - 10%SFB vs T3 - 4%BSA+1ng ($p=0,0108$), T1 - 10%SFB vs T4 - 4%BSA+10ng ($p=0,0004$), T2 - 4%BSA vs T4 - 4%BSA+10ng ($p<.0001$), T2 - 4%BSA+1ng vs T4 - 4%BSA+10ng ($p=0.0056$) e T4 - 4%BSA+10ng vs T5 - 4%BSA+100ng ($p=0,0130$). Comparando os tratamentos com diferenças significativas, notou-se que o tratamento 2 - 4%BSA (25,74%) teve uma maior frequência de oócitos maturados (em MII), do que o tratamento 1 - 10%SFB (25,44%). Já ao comparar os cinco tratamentos ente si, observou-se maiores quantidades de oócitos maturados com núcleo no estágio de metáfase II (M II) no T4 - 4%BSA+10ng (39,80%) em relação aos demais grupos, desta forma o tratamento suplementado com 4%BSA+10ng/ml de OVGP1 as 14hpm se mostrou superior no experimento 1.

Para os oócitos avaliados após as 18 hpm, os resultados indicaram diferença significativa ente: T1 - 10%SFB vs T4 - 4%BSA+10ng ($p=0,0251$), T2 - 4%BSA vs T3 - 4%BSA+10ng ($p=0.0212$) e T4 4%BSA+10ng vs T5 - 4%BSA+100ng ($p=0.0350$). Comparando os tratamentos significativos observou-se que os tratamentos suplementados com 1ng OVGP1 (T3) e 10 ng OVGP1 (T4) apresentaram maiores taxas de oócitos maturados (M II), 35,62% e 40,96% respectivamente, mostrando-se os melhores tratamentos no experimento 2.

Visando o aperfeiçoamento da maturação oocitária na PIVE em bovinos, não há relatos da utilização da glicoproteína de oviduto 1 (OVGP1), que foi revelada como a principal glicoproteína que é sintetizada e secretada exclusivamente pelo oviduto de mamífero no meio de maturação que fornece um ambiente adequado para a maturação oocitária, capacitação espermática, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial (KAWAMOTO et al., 2016), para potencializar os oócitos para subsequentemente serem fecundados, já que Bui (2002) e Choudhary et al (2017) comprovaram a eficiência da OVGP1 na fecundação de oócitos. Segundo GOMES (2006) o fluido do oviduto que por sua vez contém OVGP1 é capaz de promover um ambiente ótimo para maturação final oocitária, completando assim sua competência oocitária, corroborando com os resultados positivos desta pesquisa.

Na etapa MIV, os oócitos são frequentemente cultivados na presença das células do cumulus e sabe-se que a maturação e a aquisição da competência oocitária são processos dependentes do acoplamento metabólico entre oócito e células do cumulus, através do qual existe a passagem de diversos metabólitos que atuam no desenvolvimento do oócito (LOEWENSTEIN, 1987) e na progressão da maturação nuclear (ALBERTINI et al., 2001; LASTRO et al., 2006).

O SFB e BSA são as fontes proteicas de origem animal mais utilizadas na suplementação do meio de maturação *in vitro* (MIV), e são responsáveis pelo incremento na taxa de maturação oocitária e eficiência produtiva (ALL; SIRARD, 2002). Na produção *in vitro* utiliza-se meios de suplementação, que buscam aumentar a progressão meiótica e conseqüentemente as taxas de blastocistos, para isso busca-se meios semelhantes ao *in vivo*. Desta forma Gomes (2006) comprovou que a maturação oocitária ocorre no oviduto, lugar onde é secretado a OVGP1, assim a adição de OVGP1 se torna uma ótima opção de suplementação. De tal modo, o presente estudo comprovou os benefícios da adição de OVGP1 já que, aumentou a frequência de oócitos em estágio de metáfase II (MII), ou seja, a progressão meiótica corroborando com o estudo de Gomes (2016).

Em um trabalho realizado por Kawamoto et al., (2016) comparando as concentrações de glicoproteína específica do oviduto de porcas (pOSP) de 10- 100µg/mL vs o controle (MIV), o meio de maturação utilizado foi o North Carolina State University 23 (NCSU 23), percebeu-se que a concentração 10-100µg/mL diminuiu a polispermia quando se comparou com o controle (MIV).

Diante disso, verificaram que a adição de pOSP ao meio de fecundação reduziu a incidência de polispermia em 40%, além de diminuir o número de espermatozoides ligados ao oócito, e aumentou a taxa

de blastocistos. Além do benefício da adição da pOSP no meio de FIV, houve também melhora na produção *in vitro* de embriões com a utilização da pOSP quando esta foi adicionada horas antes da fecundação, ou seja, horas finais da maturação *in vitro*. Assim, permitiu concluir que a proteína específica do oviduto recombinante foi eficiente em melhorar a expansão dos complexo cumulus-ovócito (CCOs) por auxiliar na maturação oocitária final, já que, *in vivo*, o oviduto é responsável também pela maturação, respaldando os resultados e metodologias utilizados no presente experimento, já que o tratamento acrescido com a maior dosagem de OVGP1 no final da maturação *in vitro* tiveram bons resultados na maturação nuclear.

Kawamoto et al., (2016) ainda mostram que as células tratadas com pOSP mostraram-se com menor quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo a pOSP ser considerada um antioxidante proteico, tivemos resultados semelhantes com os tratamentos acrescidos de OVGP1, onde tiveram ganhos significativos na retomada da meiose.

No entanto, Dell Collado et al. (2014) contradizem este fato em um estudo prévio, realizado para quantificação dos ácidos graxos presentes no meio contendo 10% de SFB por meio da cromatografia gasosa do soro, e tendo em consideração as indicações do fabricante sobre o teor lipídico da BSA-FAF ($\leq 0,02\%$), onde verificaram que o meio contendo 10% de SFB proporciona dezoito vezes mais ácidos graxos do que o meio contendo apenas BSA, tais ácidos graxos auxiliam na maturação nuclear, uma vez que ajudam na retomada da meiose buscando a metáfase II (MII), este fato justifica o tratamento SFB ter maior frequência quando comparado com o tratamento BSA+1ng/ml as 14 horas após o início da maturação.

Já os resultados para as maiores dosagens acrescidas de OVGP1 foram semelhantes aos resultados de Choudhary et al. (2017), que concluíram que as taxas de clivagem dos embriões de búfalos e o desenvolvimento até o estágio de blastocisto diminuiu significativamente em concentrações acima de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de OVGP1, ocasionando em um efeito inibitório, o que indica que taxas elevadas de suplementação podem ocasionar em efeitos negativos. No presente experimento foi possível verificar que a dosagem em maior concentração da OVGP1, como de 100ng (100%), se mostrou inviável sem diferença significativa, podendo ser indicativo de que dosagens em maiores concentrações podem prejudicar o desenvolvimento, em quanto uma dosagem intermediária sendo ela de 4%BSA+ 10ng/ml de OVGP1 com este trabalho obtive-se melhores resultados.

De acordo com Choudhary et al., (2017) a taxa de fertilização em bovinos aumentou significativamente, quando os gametas foram tratados com a OVGP1. A adição de fluido do oviduto no meio de maturação mostrou que além de induzir a capacitação espermática em búfalos, javalis e bovinos, atua no final da maturação, onde tem melhores resultados para a PIVE, assim como comprovado no estudo de Gomes (2006), com isso, foi possível obter-se um resultado esperado e satisfatório já que o uso de OVGP1 foi benéfico nas quantidades de 4%BSA +10ng/ml de OVGP1 suplementados por um período de 14hpm e 18hpm, não havendo diferença nos horários de suplementação

A partir deste experimento foi possível concluir que a adição de OVGP nas dosagens 1ng e 10 ng, levando-se em consideração o período de suplementação proporciona melhor progressão meiótica nuclear dos oócitos maturados *in vitro*, possibilitando a obtenção de maiores porcentagens de oócitos com núcleo no estágio de metáfase II (M II).

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, pelo apoio financeiro através do Programa Especial de Iniciação Científica (PEIC).

À Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio – APTA.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão de bolsa de estudo de iniciação científica (IC), sob processo n° n° 2020/08325-0.

REFERÊNCIAS

ALGARRA, B. *et al.* The C-terminal region of OVGP1 remodels the zona pelúcida and modifies fertility parameters. **ScientificReports**. Murcia: Espanha, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep32556>. <https://doi.org/10.1038/srep32556>

AVILÉS, M.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; COY, P. secreções oviductais: will they be key factors for the future ARTs?. **Molecular Human Reproduction**. v. 16, p. 896–906, 12 december 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/molehr/article/16/12/896/1017991>

<https://doi.org/10.1093/molehr/gaq056>

BAVISTER, B. D., ROSE-HELLEKANT, T. A., PINYOPUMMINTR, T. Development of *in vitro* matured / *in vitro* fertilized bovine embryos into morula and blastocysts in defined culture media. **Theriogenology**. v. 37, p. 124- 46. Jan. 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90251-L](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90251-L).

BOATMAN, D. E.; MAGNONI, G. E. Identification of a Sperm Penetration Factor in the Oviduct of the Golden Hamster. **Biology of Reproduction**. v. 52, p. 199-207, jan. 1995. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/52/1/199/2761467>.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod52.1.199>

BUHI, W. C. Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. **Reproduction**. v.123, p.355-362. 2002. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/123/3/355.xml>
<https://doi.org/10.1530/rep.0.1230355>

CHOUHDARY *et al.* Effect of recombinant and native buffalo OVG1 on sperm functions and *in vitro* embryo development: a comparative study. **Jornal Animal Science Biotechnology**. Haryana: Índia. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5580196/>
<https://doi.org/10.1186/s40104-017-0201-5>

DELL COLLADO *et al.* Efeitos da redução ou substituição do soro fetal bovino por outros compostos na maturação *in vitro* de oócitos bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 34, n. 7, p. 689-694, jul. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000700014>. Acesso em: 28 set. 2019.
<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000700014>

FLOOD, L. P.; SHIRLEY, B. Reduction of embryotoxicity by protein in embryo culture media. **Molecular Reproduction Development**. v. 30, p. 226-231, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.1080300310>.

GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reproduction**. v. 14,p. 159-177, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm040>. Acesso: 17 mar. 2019.

GOMES, E.; DIEZ, C. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. **Animal Reproduction Science**. v. 58, p. 23-37, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00078-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00078-0).

GOMES. H. F. Destino da glicose e identificação da enzima GSK-3 em ovidutos de vacas zebuínas. **Universidade Estadual do Norte Fluminense**. 2006. Disponível em: http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/PGANIMAL_3898_1166523632.pdf. Acesso em: 18 jul. 2021.

GONÇALVES, P. B. D. *et al.* Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.31, n.2, p.212-217, abr./jun. 2007. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/212.pdf>.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, v.1. 2002.

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.33, n.2, p.82-94, abr./jun. 2009. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/pag82-94.pdf>.

GOUDET, G. *et al.* Equine Oocyte Competence for Nuclear and Cytoplasmic *in vitro* Maturation: Effect of Follicle Size and Hormonal Environment. **Biology of Reproduction**. v. 57, p. 232–2451, August 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.2.232>. Acesso em: 31 jul. 2019.

HEWITT, D. A. WATSON, P. F. ENGLAND, G. C. Nuclear staining and culture Requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. **Theriogenology**. v.49, p.1083-1128, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00058-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00058-2)

KAWAMOTO, T. S. *et al.* Addition of the oviduct specific protein of porcine (pOSP) and melatonin in maturation media and their effect on the *in vitro* production of pig embryos. **Medicina Veterinária Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 68 (6), Nov-Dec 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8597> Acesso em: 16 jun 2021

KING, R. S.; KILLIAN, G. J. Purification of Bovine Estrus-Associated Protein and Localization of Binding on Sperm. **Biology of Reproduction**. e. 1, v. 51, p. 34–42, 1 jul.y de 1994. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/51/1/34/2761295>.

KORHONEN, K. *et al.* Effects of Serum-Free *In vitro* Maturation of Bovine Oocytes on Subsequent Embryo Development and Cell Allocation in Two Developmental Stages of Day 7 Blastocysts. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 45, p. 42-49, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01203.x>. Acesso em: 28 Ago. 2019.

KOUBA, J. A. *et al.* Effects of the Porcine Oviduct-Specific Glycoprotein on Fertilization, Polyspermy, and Embryonic Development *In vitro*. **Biology of Reproduction**. e.1, v. 63, p. 242-250, jul. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.1.242>. Acesso em: 30 jun. 2019.

KUBELKA, M. *et al.* Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. **Gamete Research**. v. 19, p. 423-431, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.1120190414> Acesso: 24 Ago. 2019.

LASTRO, M.; COLLINS, S.; CURRIE, W.B. Adenylyl cyclases in oocyte maturation:a characterization of AC isoforms in bovine cumulus cells. **Mol. Reprod. Dev.**, v.73, p.12021210, 2006. <https://doi.org/10.1002/mrd.20509>

LI, Z. *et al.* Conditions for *in vitro* maturation and artificial activation of ferret oocytes.

Biology of Reproduction. v. 66, p. 1380-1386, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.5.1380>. Acesso em: 02 jul. 2019.

LOEWENSTEIN, W.R. The cell-to-cell channel of gap junctions. **Cell**, v.48, p.725-726, 1987. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90067-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90067-5)

LOIOLA, V. M. *et al.* Validação de um programa de produção *in vitro* de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. **Ciência Animal Brasileira**. v. 15, n. 1, p. 93-101, mar. 2014. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/23327>. Acesso em: 11 dez de 2018. <https://doi.org/10.5216/cab.v15i1.23327>

LONERGAN, P. *et al.* Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 38, p. 259- 267, 2003. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/10638213_Oocyte_and_Embryo_Quality_Effect_of_Origin_Culture_Conditions_and_Gene_Expression_Patterns. Acesso em: 23 Dez. 2019. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00437.x>

MCCAULEY, T. C. *et al.* Oviduct-Specific Glycoprotein Modulates Sperm-Zona Binding and Improves Efficiency of Porcine Fertilization *In vitro*, **Biology of Reproduction**. V. 69, Pages 828–834. 1 September 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.016444>

MEHTA, T. S. KIESSLING, A. A. Development potential of mouse embryos conceived *in vitro* and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid with or without amino acids or serum. **Biology of Reproduction**. v. 43, p. 600-606, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.43.4.600>. Acesso em: 05 set 2017.

MINGOTI, G. Z. **Maturação oocitária associada à esteroidogênese: papel do soro sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteróides**. 2000. 141 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17134/tde-07112001-095400/pt-br.php>.

MIYARA, F. *et al.* Multiparameter analysis of human oocytes at metaphase II stage after IVF failure in non-male infertility. **Human Reproduction**. v. 18, p. 1494- 1503, July 2003. Disponível em: <https://academic.oup.com/humrep/article/18/7/1494/2913442>. Acesso em: 05 out. 2019.

MOZZAQUATRO, D. F. *et al.* Produção *in vitro* de embriões bovinos em meio suplementados com fontes proteicas definidas e indefinidas. **Archives of Veterinary Science**. v. 9, n. 1, p. 101-106, April 2004. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/287593536_PRODUCAO_IN_VITRO_DE_EMBRIOES_BOVINOS_EM_MEIO_SUPLEMENTADO_COM_FONTES_PROTEICA_S_DEFINIDAS_E_INDEFINIDAS. Acesso em: 26 set. 2019. <https://doi.org/10.5380/avs.v9i1.4053>

PENITENTE, J. M. *et al.* Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes. **Animal Science Journal**. v. 86, p. 148–152, 2015. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/19581/artigo.pdf?sequence=1>. <https://doi.org/10.1111/asj.12261>

PRADEEP, M. A. *et al.* Purification, sequence characterization and effect of goat oviduct-specific glycoprotein on *in vitro* embryo development. **Theriogenology**. v. 75, p.1005-15, abr. 2011. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X10005868?via%3Di_hub. Acesso em: 25 ago. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.007>

RUSELL, F. D. *et al.* The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular Reproduction Development**. v. 73: p. 1255- 1270. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.20553>. Acesso em: 13 abr. 2019 <https://doi.org/10.1002/mrd.20553>

SAS Institute Inc. 2019. SAS/STAT® 15.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SMITZ, *et al.* Oocyte: *in vitro* maturation. In: Suh CS, Sonntag B, Erickson GF. The ovarian life cycle: a contemporary view. **RevEndocrMetabDisord**, v. 3, p. 5-12, 2004.

SUN, F. *et al.* Preantral follicle culture as a novel *in vitro* assay in reproductive toxicology testing in mammalian oocytes. **Mutagenesis**. v. 19, p. 13-25, 2004. Disponível em: <https://academic.oup.com/mutage/article/19/1/13/1098883>. Acesso em: 27 jul. 2019. <https://doi.org/10.1093/mutage/geg040>

TETZNER, T. A. D. **Efeitos da substituição do soro fetal bovino (SFB) e da albumina sérica bovina (BSA) pela ovalbumina (OVA) na produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2007. xxii, 97 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/98201>. Acesso em: 05 set 2018.

YANG, X. *et al.* Recombinant Hamster Oviductin Is Biologically Active and Exerts Positive Effects on Sperm Functions and Sperm-Oocyte Binding. **PLoS ONE**, v.10, n.4, 2015. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4388664/pdf/pone.0123003.pdf>.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123003>

AValiação DO TEOR LIPÍDICO NA MATURAÇÃO IN VITRO DE OÓCITOS BOVINOS SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES DOSAGENS DE GLICOPROTEÍNA 1 DE OVIDUTO (OVGP1)

Maria Rosa Martins Dos Santos, Jaqueline Aparecida Andrelo De Lima, Ananda Silva Coimbra, Lorryne Kerolyn Dos Santos Teles, Sheila Merlo Garcia Firetti

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP. E-mail: maria-rosa-martins@hotmail.com

RESUMO

Vários fatores afetam a aquisição da competência oocitária e o sucesso da maturação in vitro, entre eles, a quantidade de lipídeos, que quando em excesso podem liberar radicais livres (ROS), que em alta concentração prejudicam a maturação e conseqüentemente o desenvolvimento embrionário. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade de maturação in vitro de oócitos com diferentes dosagens de suplementação da OVGP1, através do teor de lipídeos. Foram utilizados oócitos de ovários de fêmeas de abatedouro, os folículos foram aspirados e os oócitos selecionados em Grau I e II. Os oócitos foram divididos em cinco grupos experimentais e dois experimentos um para cada tempo, às 14hpm e 18hpm, com cinco repetições. Os tratamentos utilizados foram um meio de maturação, acrescido de diferentes fontes proteicas como SFB, BSA e OVGP1, onde o tratamento 1 (controle) foi 10%SFB, tratamento 2 foi 4%BSA, o tratamento 3 foi 4%BSA+ 1 ng/ml OVGP1, o tratamento 4 foi 4%BSA+ 10 ng/ml OVGP1 e o tratamento 5 foi 4%BSA+ 100 ng/ml OVGP1, avaliados nos tempos de 14 e 18hpm. Para análise do teor de lipídeos, os oócitos foram desnudados, corados com SUDAN BLACK 1% e analisados em microscópio de luz. Para estimar o conteúdo lipídico os oócitos foram fotografados e as imagens convertidas em escalas de cinza e avaliadas no programa Image J. Os dados foram analisados por meio do teste ANOVA seguida pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Constatou-se que o tratamento com dosagem de 1ng, suplementado às 18hpm apresentou menor acúmulo lipídico na maturação, diferindo estatisticamente de todos os demais tratamentos avaliados nos dois tempos de suplementação: SFB ($p < 0,0001$), BSA ($p < 0,0001$), 10ng/18hpm ($p < 0,0001$), 100ng/18hpm ($p = 0,0107$), 1ng/14hpm ($p = 0,0073$), 10ng/14hpm ($p = 0,0022$), 100ng/14hpm ($p = 0,0068$). Conclui-se que menores concentrações de OVGP1 (1ng), por um menor período (18hpm) proporcionaram melhores resultados em relação ao teor lipídico em oócitos maturados in vitro.

Palavras-chave: lipídeos; produção; proteína; sudan black.

EVALUATION OF LIPID CONTENT IN THE IN VITRO MATURATION OF BOVINE OOCYTES SUPPLEMENTED WITH DIFFERENT DOSAGES OF OVIDUTE GLYCOPROTEIN 1 (OVGP1)

ABSTRACT

Several factors affect the acquisition of oocyte competence and the success of in vitro maturation, including the amount of lipids, which when in excess can release free radicals (ROS), which in high concentration impair maturation and consequently embryonic development. The objective of this work was to evaluate the quality of in vitro maturation of oocytes with different doses of OVGP1 supplementation, through the lipid content. Oocytes from the ovaries of slaughterhouse females were used, the follicles were aspirated and the oocytes selected in Grade I and II. The oocytes were divided into five experimental groups and two experiments, one for each time, at 14hpm and 18hpm, with five replications. The treatments used were a maturation medium, plus different protein sources such as FBS, BSA and OVGP1, where treatment 1 or control was 10%SFB, treatment 2 was 4%BSA, treatment 3 was 4%BSA+ 1 ng/ml OVGP1, treatment 4 was 4%BSA+ 10 ng/ml OVGP1 and treatment 5 was 4%BSA+ 100 ng/ml OVGP1, evaluated at the times of 14 and 18hpm. To analyze the lipid content, the oocytes were denuded, stained with 1% SUDAN BLACK and analyzed under a light microscope. To estimate the lipid content, the oocytes were photographed and the images converted into gray scales and evaluated in the Image J program. The data were analyzed using the ANOVA test followed by the Tukey test at a significance level of 5%, it was found that the treatment with a dosage of 1ng, supplemented at 18hpm showed lower lipid accumulation

at maturation, statistically differing from all other treatments evaluated in the two supplementation times: SFB ($p < 0.0001$), BSA ($p < 0.0001$), 10ng/18hpm ($p < 0.0001$), 100ng/18hpm ($p = 0.0107$), 1ng/14hpm ($p = 0.0073$), 10ng/14hpm ($p = 0.0022$), 100ng/14hpm ($p = 0.0068$). It is concluded that lower concentrations of OVGP1 (1ng), for a shorter period (18hpm) provided better results in relation to lipid content in oocytes matured *in vitro*.

Keywords: lipids; production; protein; sudan black.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o Brasil vem passando por um crescimento significativo no segmento das biotecnologias. Com um amplo conhecimento sobre a obtenção de embriões *in vivo* e *in vitro*, o Brasil passou a dominar a aspiração folicular e a PIVE, ganhando uma importante posição no mercado de embriões bovinos, o que o levou a ser considerado o principal exportador de carne bovina e o maior rebanho comercial do mundo (LOIOLA *et al.*, 2014).

Na produção *in vitro* de embriões, as fontes de suplementos mais utilizadas para a maturação dos oócitos, são o soro fetal bovino (SFB) e a albumina sérica bovina (BSA) (MINGOTI, 2000). No entanto, outros meios de cultivo têm sido pesquisados com o objetivo de melhorar os índices de maturação, e, o desenvolvimento embrionário. Com isso, muitas pesquisas têm sido realizadas testando a adição de proteínas para a produção de embriões, destacando a glicoproteína 1 de oviduto (OVGP1).

A OVGP1 é uma glicoproteína que possui um elevado peso molecular, e atualmente sabe-se que ela é excretada apenas pelas células epiteliais não ciliadas da trompa de Falópio (NATRAJ *et al.*, 2002; BHATT *et al.*, 2004). Primeiramente, ela foi determinada como uma proteína secretada por indução do estrogênio no oviduto, devido a isso, ela é caracterizada como uma glicoproteína que é dependente do estrogênio e específica do oviduto. A OVGP1 apresenta um importante papel para a técnica de produção de embriões *in vitro*, havendo a necessidade de mais pesquisas para mais resultados quanto a sua utilização e substituição aos meios de cultivos utilizados para a técnica da produção de embriões *in vitro* (ALGARRA *et al.*, 2016).

Os lipídeos são essenciais nas células, pois são eles que fornecem energia necessária para o metabolismo. Só que durante a β -oxidação os lipídeos liberam radicais livres (ROS), que em alta concentração pode oferecer perigo para as mitocôndrias, podendo afetar o seu comportamento (DUVNJAK *et al.*, 2007), e dessa maneira, o excesso de lipídeos na PIVE e a alta concentração de ROS podem ser os principais motivos para que tenha estudos visando o acúmulo lipídico em oócitos e embriões PIVE. Por esses motivos, tem sido realizada pesquisas a respeito das funções fisiológicas dos lipídeos e sobre os inconvenientes provocados com o massivo acúmulo das gotas lipídicas citoplasmáticas (BARRONDO, 2013).

No Brasil, o crescimento da PIVE permitiu sua aplicação em larga escala, e com isso a exportação desse modelo para vários países. Mas mesmo através de muitos esforços para que haja uma melhoria na produção *in vitro* de embriões PIVE para fins comerciais ou científicos, ainda é relativamente baixa sua eficiência, pois, apenas de 35 a 40% dos oócitos maturados (MIV) fecundados (FIV) e cultivados *in vitro* (CIV) vão se desenvolver. Essas baixas taxas de desenvolvimento podem ser determinadas por fatores ambientais ou pelas próprias características do sistema de PIVE de embriões, que vão atuar na maturação, fecundação e no cultivo, e também pode ser pela remoção do oócito do folículo, o que causa a perda da interação morfológica, hormonal e molecular entre células foliculares e oócitos. (GOTTARDI; MINGOTI, 2009).

Na PIVE, após a aspiração e seleção, os oócitos são submetidos à MIV que segundo Penitente Filho *et al.* (2015), a fase de maturação nuclear compreende a progressão do estágio diplóteno prófase I até o período da metáfase II, processo que leva cerca de 18 a 24 horas em atmosfera controlada, contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2002).

Esta é uma técnica que consiste na obtenção, sob condições artificiais, da maturação de oócitos, (GONÇALVES *et al.*, 2007), permitindo que os oócitos, independentemente da fase da onda folicular, que se encontram em P I, retomem a meiose e atinjam a fase de M II, e adquiram a competência para serem fecundados e, assim, iniciem a embriogênese (SMITZ *et al.*, 2004).

As gotas lipídicas e as mitocôndrias estão intimamente relacionadas e são consideradas de extrema importância, pois são responsáveis pelo suporte energético das células.

Em bovinos parece haver um consentimento melhor sobre o comportamento lipídico. Um padrão lipídico foi achado em estudos realizado com microscopia eletrônica, onde os lipídeos e as mitocôndrias

migraram em sincronia, desde a periferia até a localização no citoplasma. Em suínos a migração dessas organelas também foi conjunta, porém, em equinos, estudos feitos relatam que durante a MIV ocorre assincronia na migração dessas organelas, e as gotas lipídicas foram distribuídas na periferia, e as mitocôndrias foram encontradas de forma heterogênea no citoplasma. Poucos estudos atualmente relatam a migração dessas organelas, e por não haver um consenso durante a maturação sobre o que acontecem com essas organelas, com isso estudos mais aprofundados são necessários (STURMEY *et al.*, 2006).

Os lipídeos são essenciais nas células, mas durante a β -oxidação os lipídeos liberam ROS, que em alta concentração pode oferecer perigo as mitocôndrias, podendo afetar seu comportamento (DUVNJAK *et al.*, 2007), o excesso de lipídeos na PIVE e a alta concentração de ROS pode ser os principais motivos para que tenha estudos visando o acúmulo lipídico em oócitos e embriões PIVE. Por esses motivos tem sido realizadas pesquisas a respeito das funções fisiológicas dos lipídeos e sobre os inconvenientes provocados com o massivo acúmulo das gotas lipídicas citoplasmáticas (BARRONDO, 2013).

Ainda é desconhecido o período exato em que os lipídeos se acumulam no oócito, mas alguns estudos apontam que na MIV os períodos mais susceptíveis a esses acúmulos são as últimas etapas da maturação. É muito importante esclarecer o comportamento lipídico na maturação de oócito, para que possamos compreender o acúmulo lipídico nas fases embrionárias (BARRONDO, 2013).

Na PIVE, os meios de cultivo ou as fontes de suplemento mais utilizados são o soro fetal bovino (SFB) e a albumina sérica bovina (BSA). No entanto, a albumina sérica bovina tem sido muito usada na substituição do soro por ser considerada um suplemento proteico semi-definido (MINGOTI, 2000), enquanto o SFB ainda possui componentes complexos e não definidos em sua mistura (TETZNER, 2007). A utilização do soro nos meios de cultivo é capaz de aumentar o número de embriões bovinos produzidos *in vitro* (ALI; SIRARD, 2002), pela melhoria nos índices na produção de blastocistos (GOMES; DIEZ, 2000) e por favorecer a continuidade às próximas fases do desenvolvimento embrionário. Entretanto, a utilização do soro no cultivo tem demonstrado provocar alterações no metabolismo do embrião (REIS, 2004). Aparentemente, essas alterações ocorrem nas primeiras etapas do desenvolvimento embrionário e geram um aumento nas concentrações de ácidos graxos que resulta no acúmulo lipídico nos blastocistos e citoplasma de embriões produzidos *in vitro*, diminuindo assim, as taxas de sobrevivência dos embriões após serem submetidos a criopreservação (RIZOS *et al.*, 2002). O soro também pode fazer com que ocorra modificações na expressão gênica do embrião (LAZZARI *et al.*, 2002; WRENZYCKI *et al.*, 1999; RIZOS *et al.*, 2002), além de não ser capaz de fornecer todos os nutrientes necessários ao embrião por ser um meio de cultivo com variações indefinidas de substâncias e nas concentrações dessas substâncias (TETZNER, 2007). Pesquisas também mostram que devido o SFB ser proveniente de uma parcela dos componentes sanguíneos de bovinos, do fluido produzido pela coagulação sanguínea, pode ser porta de entrada para muitas substâncias patogênicas ao meio de cultivo (BAVISTER; HELLEKANT; PINYOPUMMINTRT, 1992; KRISHER; BAVISTER, 1999; HAN; NIWA, 2003).

O BSA possui fatores que viabilizam o desenvolvimento embrionário. Ele é uma fonte de proteínas muito empregada em meios de cultivo, pois garante uma proteção ao embrião em cultivo contra eventuais elementos tóxicos encontrados nos meios de cultura, graças a sua propriedade de ligação (FLOOD e SHIRLEY, 1991). Além disso, segundo Mehta e Kiessling (1990) o BSA é capaz de equilibrar o pH, e é capaz também, de fazer com que as células não se preguem em superfícies de plásticos e de vidro, devido possuir uma propriedade surfactante (PINYOPUMMINTR; BAVISTER, 1994 apud TETZNER, 2007).

Outros meios de cultivo têm sido pesquisados com o objetivo de melhorar os índices de maturação, e o desenvolvimento embrionário. Com isso, muitas pesquisas têm sido realizadas testando a adição de proteínas para a produção de embriões, destacando a glicoproteína 1 de oviduto (OVGP1). Primeiramente, ela foi caracterizada como uma proteína secretada por indução do estrogênio no oviduto, devido a isso ela é caracterizada como uma glicoproteína que é dependente do estrogênio e específica do oviduto. No entanto, pesquisas recentes têm mostrado que a OVGP1 também contribui nos processos que ocorrem para a capacitação do espermatozoide, fertilização, e ao desenvolvimento embrionário inicial (BUHI, 2002; CHOUDHARY, 2017).

Um estudo levantado por Algarra *et al.*, (2016) mostrou que a atividade biológica da OVGP1 ocorre de maneira distinta entre as espécies. Em sua pesquisa, é apresentado que a OVGP1 auxilia o processo da capacitação e fertilização espermática em fêmeas bovinas (KING e KILLIAN 1994); intensifica a união entre o espermatozoide (YANG *et al.*, 2015) e aumenta os índices de penetração da zona em hamster (BOATMAN e MAGNOMI, 1995) e em humano (O'DAY BOWMAN *et al.*, 1996); promove um bloqueio à polispermia ao

melhorar a clivagem e a formação do embrião caprino (PRADEEP *et al.*, 2011); e em suínos, ela colabora ao controlar a polispermia (AVILÉS, GUTIÉRREZ-ADÁN, COY, 2010), torna eficiente a fertilização *in vitro* (MCCAULEY *et al.*, 2003) e promove um aumento na taxa de blastocisto (KOUBA *et al.*, 2000). Diante dos estudos apresentados, a OVG1 apresenta um importante papel para a técnica de produção de embriões *in vitro*, havendo a necessidade de mais pesquisas para mais resultados quanto a sua utilização e substituição aos meios de cultivos utilizados para a técnica da produção de embriões em laboratório (ALGARRA, *et al.*, 2016).

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência das diferentes dosagens de suplementação proteica com glicoproteína do oviduto (OVGP1) sobre a aquisição da competência oocitária na maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Comparar o potencial de maturação de oócitos bovinos mediante avaliação do acúmulo lipídico antes e após a maturação *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido no laboratório de PIVE, da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE – Campus II em Presidente Prudente - SP. Para sua realização foram utilizados ovários de fêmeas bovinas sem raça definida, provenientes do abatedouro Gold Carnes, no município de Regente-Feijó – SP, que se encontra na Estrada Vicinal Prefeito Fouad Youssef Marakari.

Os ovários foram transportados para o laboratório em garrafa térmica contendo solução salina a 0,9% de NaCl, em temperatura de 37°C, por um período máximo de uma hora.

No laboratório, os ovários foram lavados com solução salina e mantidos em banho-maria a 37°C até serem aspirados. Para a aspiração folicular os ovários foram limpos com gaze estéril, e os folículos visíveis foram aspirados com auxílio de seringas de 20mL com extremidade de agulha 18G. O líquido folicular aspirado permanecerá nos tubos de ensaio, em banho-maria a 37°C, em posição vertical por cerca de 15 minutos, para que a solução decante.

Após a aspiração o sedimento, contendo os oócitos, foi depositado em placa de Petri marcada, para posteriormente fazer a procura dos oócitos, em lupa esteromicroscópica (SMZ 745T, Nikon, Tóquio, Japão), com aumento de 7,5x.

Os oócitos recuperados foram classificados de acordo com o aspecto morfológico dos complexo cúmulo-oócito (COC's), segundo Lonergan *et al.* (2003), em 5 grupos de qualidade, onde Grau I = células do cumulus compacto presente, contendo mais de três camadas de células; Grau II = células do cumulus compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares; Grau III = células do cumulus presente, com apenas uma camada de célula; Desnudo = ausência de camada de células do cumulus e Atrésicos = células do cumulus em regressão celular.

Em cada repetição, do total de oócitos recuperados, 15 oócitos foram avaliados antes da maturação e os demais foram submetidos à maturação *in vitro* de acordo com os grupos experimentais.

Após a aspiração, seleção e classificação dos oócitos em grau I, II, os oócitos foram divididos em cinco grupos experimentais e dois experimentos um para cada tempo, às 14 horas após maturação (hpm) e 18 horas após maturação (hpm), com cinco repetições. Os tratamentos utilizados foram um meio de maturação, acrescido de diferentes fontes de proteína SFB e BSA e OVG1, onde: Tratamento 1 (controle) = meio de maturação com 10%SFB (soro fetal bovino), Tratamento 2 (controle 2) = meio de maturação com 4%BSA (albumina sérica bovina), Tratamento 3 = meio de maturação com 4%BSA + OVG1 com dosagem de 1 ng/ml, Tratamento 4 = meio de maturação com 4%BSA + OVG1 com dosagem de 10ng/ml e Tratamento 5 = meio de maturação com 4%BSA + OVG1 com dosagem de 100ng/ml.

Para cada repetição, grupos de no máximo 15 oócitos, foram depositados em gotas de 90 µL contendo meio base de maturação TCM-199 (M-3769, Sigma Co., St. Louis, EUA), 2,2 mg/mL de solução de bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de piruvato de sódio, 50 µg/mL de sulfato de gentamicina suplementado com 1 µg/mL de FSH (Folltropin®-V Bioniche, Inc., Canadá), 5 µg / mL de LH (Lutropin® Bioniche, Inc., Canadá), acrescidos de SFB ou BSA ou BSA + OVG1 (de acordo com o grupo experimental) que foram acrescidos ao meio às 14 e 18hpm, onde os grupos suplementados às 14hpm receberam a proteína nas 8 horas finais de maturação e o grupo às 18hpm receberam nas 4 horas finais e então cobertas com óleo mineral (M8410, Sigma Co., St. Louis, EUA), em placa de petri (35x10 mm), mantidos à temperatura de 38,5°C em atmosfera gasosa de 5% de CO₂ em ar e com máxima umidade, por um período de 22 horas.

Para a avaliação de gotas lipídicas, os oócitos imaturos e maturados dos 4 grupos experimentais foram fixados separadamente em 500µL de PAF 4% em uma placa de 4 poços por 2 horas, em seguida foram lavados em duas gotas de PBS + PVP (1%) de 50µL, depois colocados no segundo poço com 500µL PBS + PVP (1%) e lavados em duas gotas de 50µL com H₂O + PVP, em uma placa de 60mm. Os oócitos foram então incubados em 500µL de etanol 50% por 2 minutos. Após, foram corados, em uma gota de 50µL de Sudan Black B 1% (199664, Sigma Co., St. Louis, EUA), por 2 minutos, em uma placa de 60mm. Em seguida foram lavados 3 vezes em etanol 50% e incubados por 5 minutos em 500µL de H₂O + PVP, por 5 minutos.

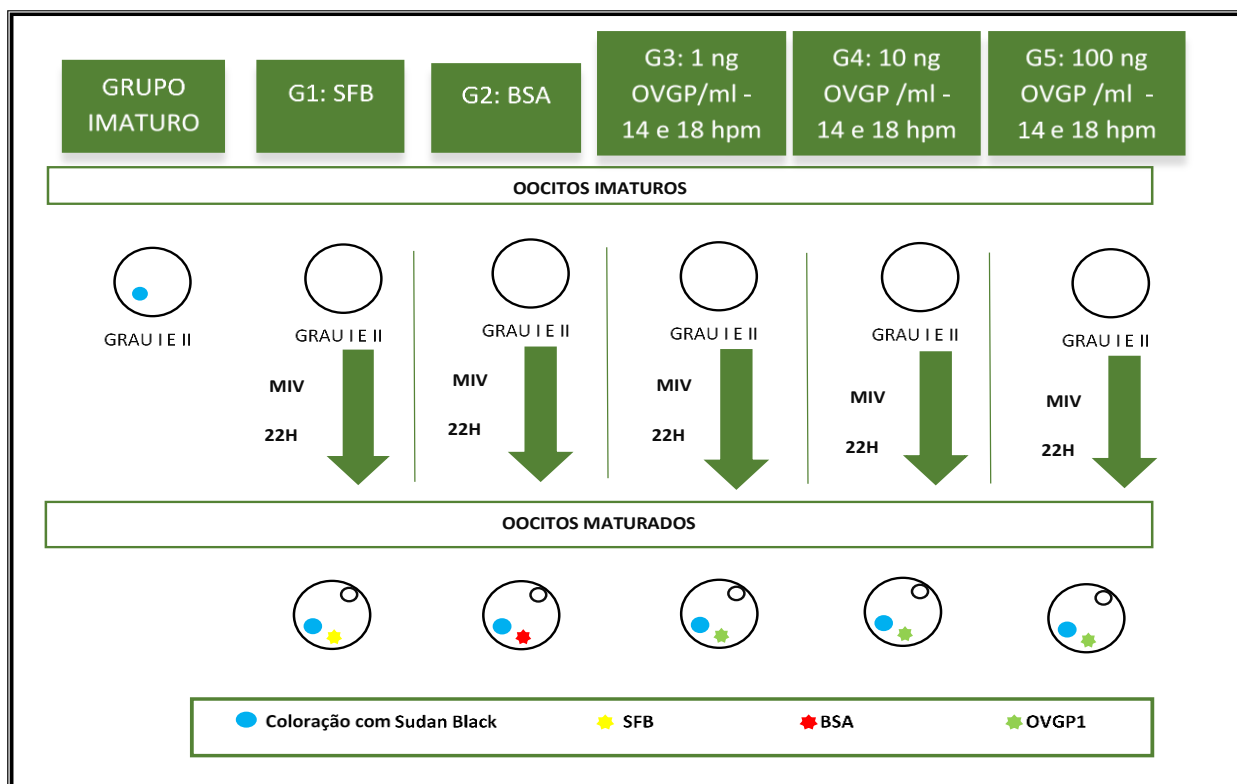
Feito o processo de coloração, os oócitos foram transferidos para lâminas de vidro, em gotas 10 µL de glicerol, recobertas com lamínulas vedadas com esmalte, e analisados em microscópio de luz (DMLS; Leica), para avaliação da quantidade de gotas de lipídeo em cada oócito.

As lâminas foram levadas para análise no laboratório da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), em Presidente Prudente-SP, situado na Rodovia Raposo Tavares, km 561.

As imagens foram fotografadas e analisadas pelo software Image J, por conversão em escala de cinza e determinação da área e da intensidade média (pixels) estimando-se o conteúdo lipídico médio em unidades arbitrárias.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 01. Desenho experimental. Foram selecionados oócitos grau I e II. Um grupo de oócitos foi avaliado mediante coloração com Sudan Black antes da maturação. Os demais oócitos foram divididos igualmente entre os grupos experimentais, de acordo com a suplementação proteica e a variável de tempo e avaliados mediante coloração com Sudan Black B após o período de maturação *in vitro* de 22 horas.



ANÁLISE DOS RESULTADOS

Foi realizado, primeiramente, uma análise exploratória dos dados, onde verificou-se que a pressuposição de normalidade não foi atendida, assim foi necessário transformar os dados originais através da potência ótima de Box-Cox (1964) pelo Log₁₀. O efeito da suplementação da maturação sobre a qualidade de maturação foi analisado por meio do teste de ANOVA seguida de teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa computacional Statistical Analysis System for Windows (SAS Inst., Inc., Cary, NC).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliação do teor lipídico foram recuperados 1224 oócitos totais, divididos entre o grupo de oócitos imaturos (n=225), tratamentos controle: T1 (n=119) e T2 (n=117), experimento 1: suplementação às 14hpm (n=383), experimento 2: suplementação às 18hpm (n=380). Os oócitos de cada experimento foi dividido entre os tratamentos conforme demonstrado nas figuras 2 e 3.

Na Figura 2 e 3 estão descritos os resultados do teor lipídico semiquantitativo médio e a quantidade de oócitos avaliados, dos experimentos 1 e 2, respectivamente, de oócitos maturados *in vitro*, separados pelo tempo de suplementação após a maturação.

Figura 2. Teor lipídico de oócitos maturados *in vitro* após 14 horas de maturação. Não houve diferença significativa entre os grupos

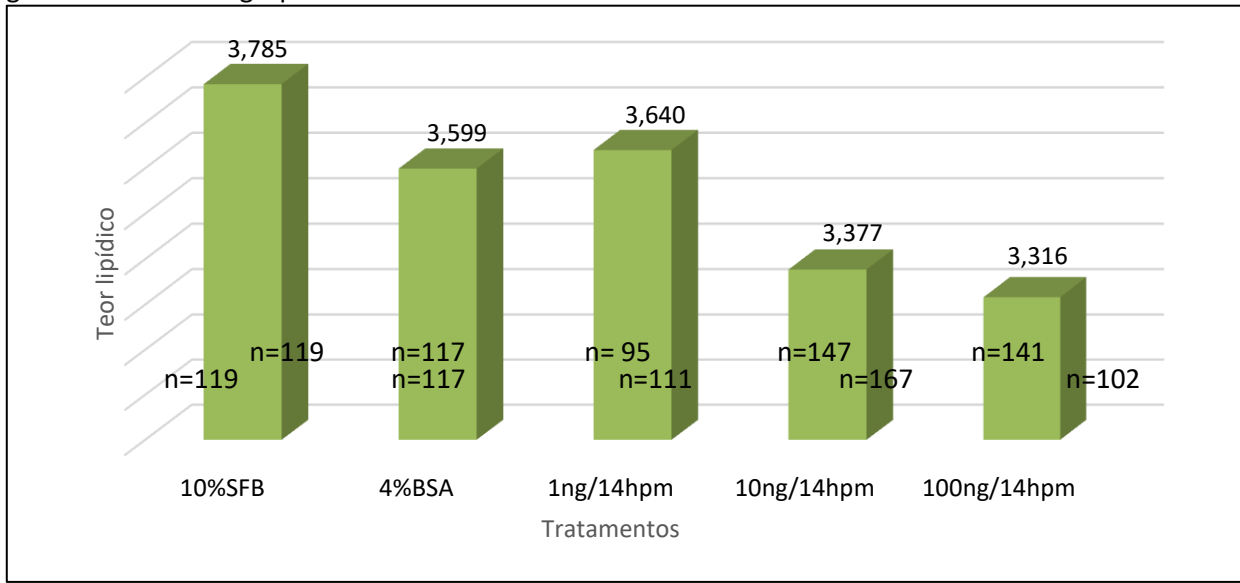
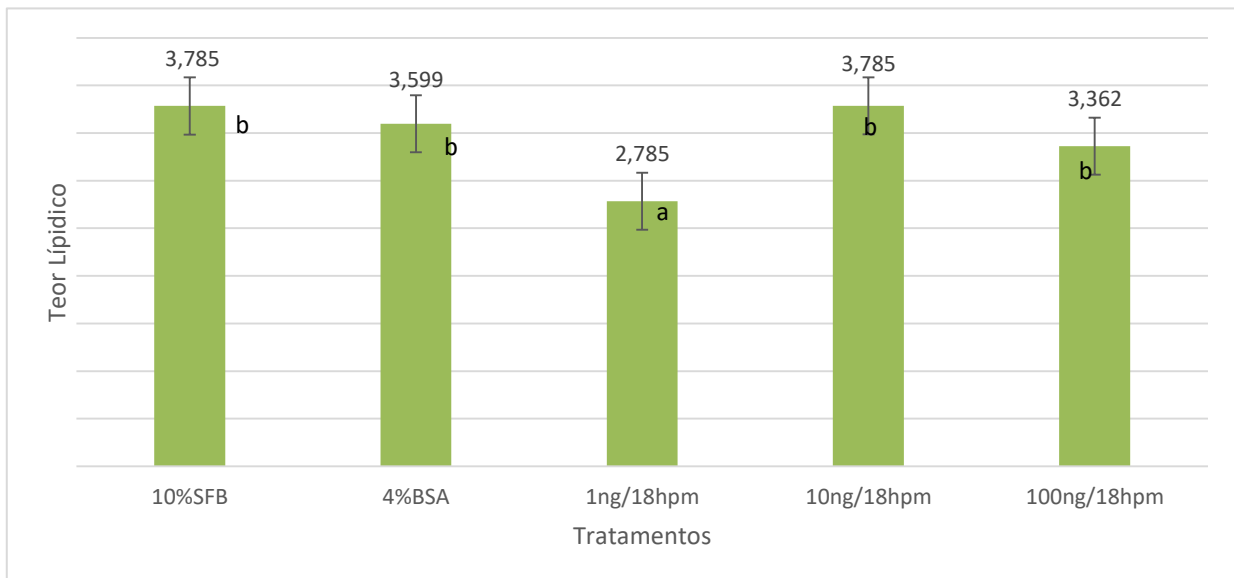
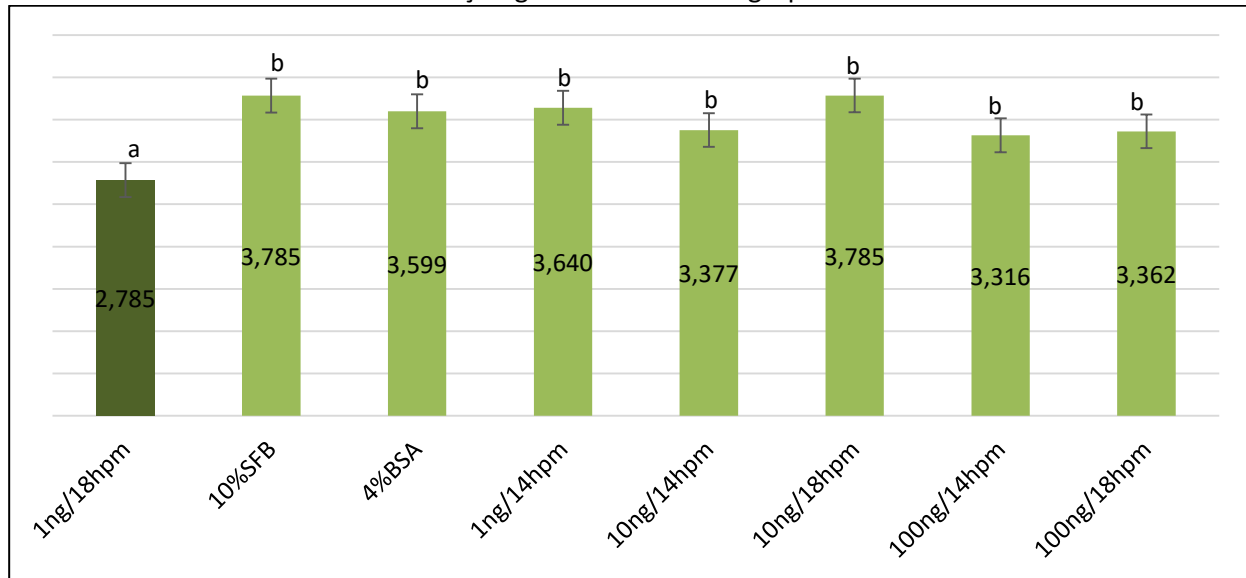


Figura 3. Teor lipídico de oócitos maturados *in vitro* após 18 horas de maturação. Teste T ($\alpha=5\%$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.



De acordo com os resultados obtidos nas figuras 2 e 3, com a média semiquantitativa da avaliação do teor de lipídeos, observou-se que os oócitos maturados do experimento 1 não tiveram diferença significativa entre eles, já o tratamento de 1ng do experimento 2, teve diferença significativa dos demais tratamentos, onde obteve um menor acúmulo lipídico quando comparados com os outros, como representado na figura 4.

Figura 4. Teor lipídico de oócitos onde a fonte proteica de 4%BSA + 1ng OVGP1 após 18 horas de maturação apresentou diferença significativa dos demais tratamentos. Teste T ($\alpha=5\%$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.



O tratamento de 4%BSA + 1ng OVGP1 com 18hpm, diferiu dos tratamentos com meio de maturação de 10%SFB ($p<0,0001$) e 4%BSA ($p<0,0001$), além de diferir dos tratamentos com dosagem de 4%BSA + 1ng OVGP1 de 14hpm ($p=0,0073$), do de 4%BSA + 10ng OVGP1 de 14hpm ($p=0,0022$) e 18hpm ($p<0,0001$) e também do de 4%BSA + 100ng OVGP1 de 14hpm ($p=0,0068$) e 18hpm ($p=0,0107$), sendo este o melhor resultado que foi obtido de acordo com a análise estatística. De acordo com a figura 4, o teor lipídico do tratamento de 1ng e 18hpm teve um menor acúmulo de lipídeos que os dos outros tratamentos, demonstrando que para esta pesquisa, um alto teor de lipídeos pode ser prejudicial para o processo de maturação *in vitro*.

Ainda, de acordo com os resultados obtidos nas figuras 5 e 6, com a média semiquantitativa da avaliação do teor de lipídeos, observou-se diferença significativa entre oócitos imaturos e o tratamento com dosagem de 10%SFB ($p=0,0053$) e também com o tratamento de dosagem de 4%BSA + 10ng OVGP1 e tempo de 18hpm ($p=0,0143$).

Figura 5. Teor lipídico de oócitos maturados *in vitro* após 14 horas de maturação comparados com o grupo de imaturos. Teste T ($\alpha=5\%$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.

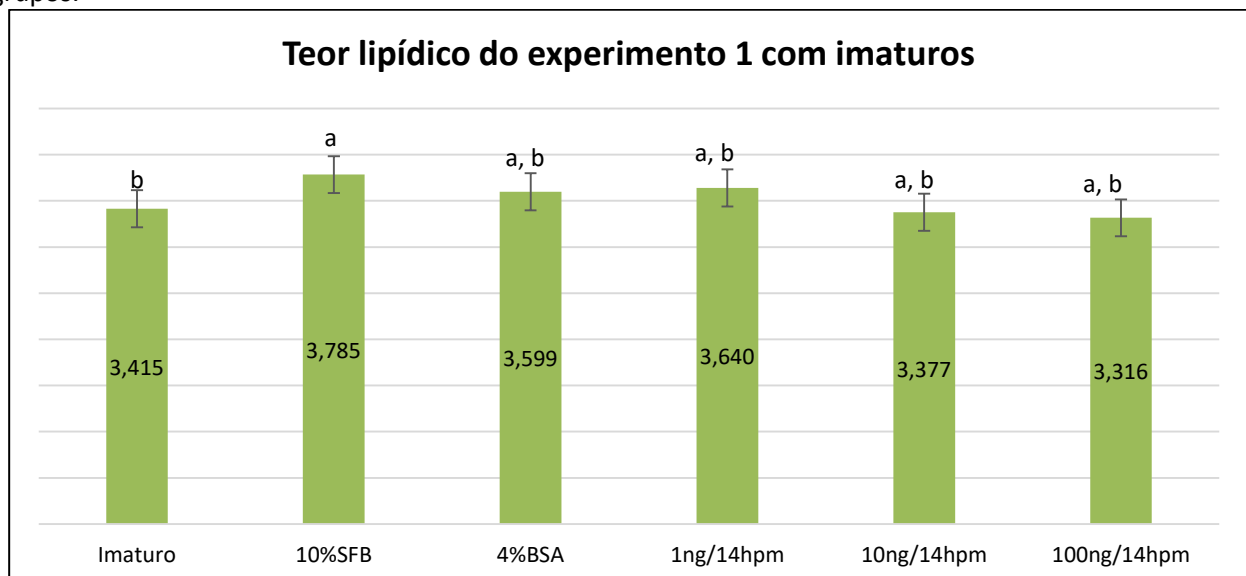
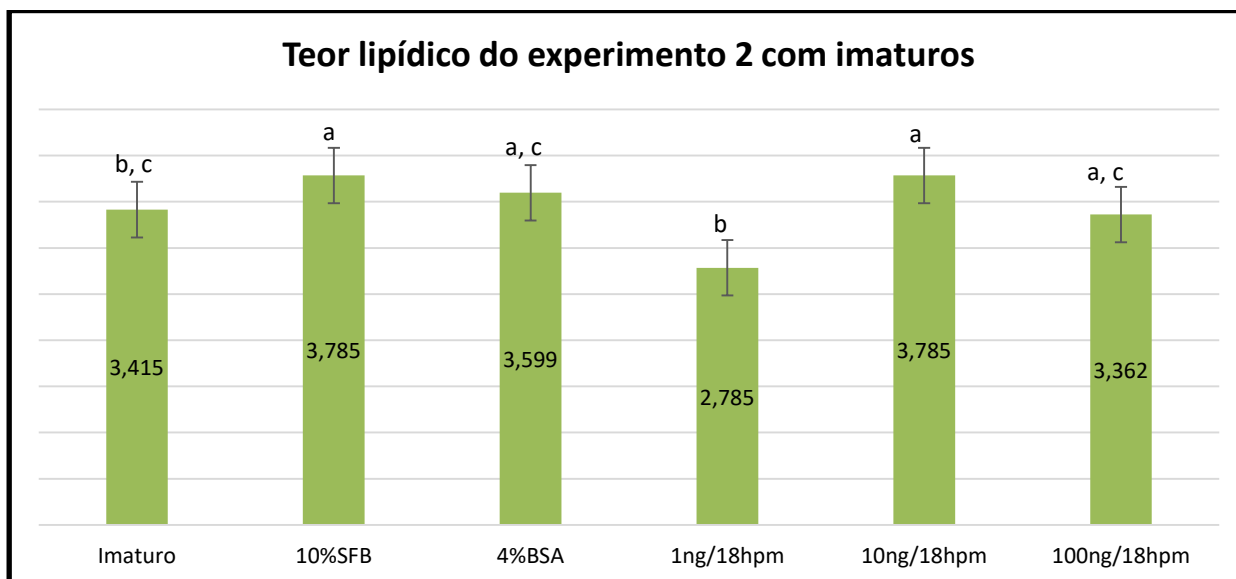


Figura 6. Teor lipídico de oócitos maturados *in vitro* após 18 horas de maturação comparados com o grupo de imaturos. Teste T ($\alpha=5\%$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos.



Com o propósito de potencializar a MIV, o presente estudo testou dosagens diferentes da suplementação proteica com OVGP1, que é uma glicoproteína específica do oviduto de mamíferos, que fornece um ambiente adequado a maturação oocitária. Estudos constataram um aumento na taxa de fertilização *in vitro* e o desenvolvimento embrionário em cabras com o uso dessa glicoproteína (CHOUDHARY *et al.*, 2017). Entretanto, este é o primeiro a determinar o teor de lipídios na maturação *in vitro* de oócitos bovinos utilizando diferentes dosagens de OVGP1, buscando dessa forma, melhorar os resultados obtidos na maturação oocitária, mediante utilização dessa proteína.

Segundo o estudo de Haggarty *et al.* (2006), diz que durante o período da maturação oocitária os lipídeos do fluido folicular tendem a se acumular no interior dos oócitos, e produzem uma futura reserva para o seu desenvolvimento embrionário. Segundo Kim *et al.* (2001) o analisar o comportamento dos ácidos graxos de oócitos bovinos frescos e congelados antes e após a maturação, observou que não houve diferença na disponibilidade dos lipídios para seu uso como fonte de energia pelos oócitos, e ainda foi possível determinar que durante o processo de maturação ocorre o descolamento dos lipídeos séricos para o citoplasma dos oócitos, resultando na tendência de acúmulo de lipídeo durante a MIV.

A utilização de SFB na PIVE, apresenta algumas limitações que podem prejudicar a qualidade dos embriões, com isso busca se alternativas para substituí-lo por outros meios. De acordo com Barrondo (2013), o soro fetal bovino é um dos fatores que mais impacta no acúmulo lipídico, onde observou que o meio contendo o SFB teve dezoito vezes mais lipídeos que o meio BSA e ainda, constatou que a maturação *in vitro* provoca também acúmulo lipídico, sendo mais acentuada nos grupos que foram suplementados com SFB, contudo, a albumina sérica não se mostrou um meio capaz de substituir o soro pois não levou a taxas satisfatórias na maturação oocitária.

No entanto, se o intuito for a criopreservação, de acordo com Lima (2011) o acúmulo lipídico no citoplasma dos embriões é um ponto crítico, sendo preciso utilizar de um meio que não apresente uma alta concentração de lipídeos, onde a alternativa seria utilizar uma menor concentração de SFB combinada com BSA que resulta em uma redução no acúmulo de lipídeos onde essa diminuição de concentração na MIV não afetará as taxas de produção (DEL COLLADO *et al.*, 2015). Portanto a utilização do BSA quando comparado com o SFB, não se mostra uma fonte com alto teor lipídico, mostrando ser uma alternativa para utilização em procedimentos que visem a criopreservação.

Segundo Choudhary *et al.* (2017), as taxas de clivagem dos embriões de búfalos e o desenvolvimento até o estágio de blastocisto diminuiu significativamente em concentrações acima de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, exibindo um efeito inibitório, o que indica que taxas elevadas de suplementação podem ocasionar em efeitos negativos. Nesta pesquisa é possível ver que a dosagem em menor concentração da OVGP1, como de 1ng e após 18 horas de maturação, mostrou um menor acúmulo lipídico, que para a pesquisa foi um

bom resultado pois apresentou diferença significativa das dosagens maiores como de 10ng e 100ng para ambas variáveis de tempo, podendo ser indicativo que dosagens em maiores concentrações podem prejudicar o desenvolvimento na MIV.

A suplementação feita após 18hpm de maturação associada a dosagem de 4%BSA + 1ng OVGP1 se mostrou melhor quando comparada com as do período de após 14 horas de maturação, esse efeito pode se dar por conta de a suplementação ser feita por um longo período até completar o total de 22 horas de maturação estar sobrecarregando a MIV. O mesmo ocorreu no estudo de Ali e Sirard (2002), onde a suplementação proteica com BSA em oócitos bovinos foi realizada após 6 e 18 horas de maturação, que apresentou resultados de efeito inibitórios para o tempo de 6 horas, demonstrando que um período maior de suplementação pode afetar negativamente a maturação dos oócitos.

Conclui-se que a suplementação com menores concentrações de OVGP1 (1ng), por um menor período (18hpm) proporcionou menor acúmulo lipídico nos oócitos, demonstrando efeito positivo sobre a maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE.

À Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio – APTA, pelo apoio logístico e de infraestrutura.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão de bolsa de estudo de iniciação científica (IC), sob processo nº 2020/10106-4.

REFERÊNCIAS

ALGARRA, B. *et al.* The C-terminal region of OVGP1 remodels the zona pelúcida and modifies fertility parameters. **ScientificReports**. Murcia: Espanha, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep32556>
<https://doi.org/10.1038/srep32556>

ALI, A.; SIRARD, M. A. Effect of the Absence or Presence of Various Protein Supplements on Further Development of Bovine Oocytes During *In Vitro* Maturation, **Biology of Reproduction**. V. 66, p. 901-905, 1 de abr. de 2002. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/66/4/901/2723810>.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod66.4.901>

AVILÉS, M.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; COY, P. secreções oviductais: will they be key factors for the future ARTS?. **Molecular Human Reproduction**. v. 16, p. 896–906, 12 december 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/molehr/article/16/12/896/1017991>
<https://doi.org/10.1093/molehr/gaq056>

BARRONDO, M. D. C. **Influência de diferentes suplementos na maturação oocitária sobre o acúmulo de lipídeos citoplasmáticos em oócitos e embriões bovinos cultivados *in vitro***. 2013 p. 67 Dissertação (Mestrado Reprodução Animal) – Unesp, Campus de Jaboticabal. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/98173/000735355.pdf?sequence=1&isAllowed=>>.

BAVISTER, B. D., ROSE-HELLEKANT, T. A., PINYOPUMMINTR, T. Development of *in vitro* matured / *in vitro* fertilized bovine embryos into morula and blastocysts in defined culture media. **Theriogenology**. v. 37, p. 124- 46. Jan. 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90251-L](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90251-L).

BOATMAN, D. E.; MAGNONI, G. E. Identification of a Sperm Penetration Factor in the Oviduct of the Golden Hamster. **Biology of Reproduction**. v. 52, p. 199-207, jan. 1995. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/52/1/199/2761467>
<https://doi.org/10.1095/biolreprod52.1.199>

BHATT, P. *et al.* Fertilization, embryonic development and oviductal environment: role of estrogen induced oviductal glycoprotein. **Indian Journal Experimental Biology**. v 42, p.1043-55. Índia, 2004. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/8141143_Fertilization_embryonic_development_and_oviductal_environment_Role_of_estrogen_induced_oviductal_glycoprotein.

BUHI, W. C. Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. **Reproduction**. v.123, p.355-362. 2002. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/123/3/355.xml>
<https://doi.org/10.1530/rep.0.1230355>

CHOUHDARY *et al.* Effect of recombinant and native buffalo OVGP1 on sperm functions and *in vitro* embryo development: a comparative study. **Jornal Animal Science Biotechnology**. Haryana: Índia. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5580196/>
<https://doi.org/10.1186/s40104-017-0201-5>

DUVNJAK, M. *et al.* Pathogenesis and management issues for nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal os Gastroenterology**., v.13, p.4539-4550, 2007. Disponível em:<
http://medlib.mef.hr/285/1/Duvnjak_M_Pathogenesis_and_management_rep_285.pdf>.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i34.4539>

FLOOD, L. P.; SHIRLEY, B. Reduction of embryotoxicity by protein in embryo culture media. **Molecular Reproduction Development**. v. 30, p. 226-231, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.1080300310>

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, v.1. 2002.

GONÇALVES, P. B. D. *et al.* Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.31, n.2, p.212-217, abr./jun. 2007. Disponível em: <http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/212.pdf>.

GOMES, E.; DIEZ, C. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. **Animal Reproduction Science**. v. 58, p. 23-37, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00078-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00078-0).

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.33, n.2, p.82-94, abr./jun. 2009. Disponível em: <http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/pag82-94.pdf>.

HAGGARTY, P. *et al.* Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. **Human Reproduction**, v. 21, p. 766–773, 2006. Disponível em: <<https://academic.oup.com/humrep/article/21/3/766/770263>>.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dei385>

HAN, M. S.; NIWA, K. Effects of BSA and fetal bovine serum in culture medium on development of rat embryos. **Journal of Reproduction and Development**. v. 49, p. 235-242. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14967933> <https://doi.org/10.1262/jrd.49.235>

KIM, J.Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature an *in vitro* matured bovine oocyte. **Reproduction**. v. 122, p. 131– 138, 2001. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/122/1/131.xml> <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220131>

KING, R. S.; KILLIAN, G. J. Purification of Bovine Estrus-Associated Protein and Localization of Binding on Sperm. **Biology of Reproduction**. e. 1, v. 51, p. 34–42, 1 jul.y de 1994. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/51/1/34/2761295>
<https://doi.org/10.1095/biolreprod51.1.34>

KOUBA, J. A. *et al.* Effects of the Porcine Oviduct-Specific Glycoprotein on Fertilization, Polyspermy, and Embryonic Development *In Vitro*. **Biology of Reproduction**. e.1, v. 63, p. 242-250, 1 de jul. de 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.1.242>. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.1.242>

KRISHER, R. L.; BAVISTER, B. D. Enhanced glycolysis after maturation of bovine oocytes *in vitro* is associated with increased developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**. v. 53, p.19-26. 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10230813/> [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199905\)53:1<19::AID-MRD3>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199905)53:1<19::AID-MRD3>3.0.CO;2-U)

LAZZARI, G. *et al.* Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. **Biology of Reproduction**. v. 67, e. 3, p. 767–775, 1 September 2002. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/67/3/767/2683388> <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.004481>

LIMA, M. R. D. **Estudo comparativo entre fontes de macromoléculas na produção *in vitro* de embriões bovinos e seus reflexos na criopreservação**. 2011. Dissertação (Mestrado Reprodução Animal) – Unesp, Campus de Jaboticabal. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/98185>>.

LOIOLA, V. M. *et al.* Validação de um programa de produção *in vitro* de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. **Ciência Animal Brasileira**. v. 15, n. 1, p. 93-101, 28 mar. 2014. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/23327> <https://doi.org/10.5216/cab.v15i1.23327>

MEHTA, T. S.; KIESSLING, A. A. Development potential of mouse embryos conceived *in vitro* and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid with or without amino acids or serum. **Biology Reproduction**. v. 43, p. 600-606, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.4.600> <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.4.600>

MINGOTI, G. Z. **Maturação oocitária associada à esteroidogênese: papel do soro sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteróides**. 2000. 141 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17134/tde-07112001-095400/pt-br.php>.

MCCAULEY, T. C. *et al.* Oviduct-Specific Glycoprotein Modulates Sperm-Zona Binding and Improves Efficiency of Porcine Fertilization *In Vitro*, **Biology of Reproduction**. V. 69, Pages 828–834. 1 September 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.016444>. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.016444>

NATRAJ, U. *et al.* Overexpression of Monkey Oviductal Protein: Purification and Characterization of Recombinant Protein and Its Antibodies. Society for the Study of Reproduction. **Biology of Reproduction**. v. 67, p.1897-1906. Mumbai: Índia, 2002. Disponível em: <http://www.bioone.org.ez259.periodicos.capes.gov.br/doi/pdf/10.1095/biolreprod67.6.1897> <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.6.1897>

O'DAY-BOWMAN *et al.* Association of Oviduct-Specific Glycoproteins with Human and Baboon (*Papio Anubis*) Ovarian Oocytes and Enhancement of Human Sperm Binding to Human Hemizonae Following *In Vitro* Incubation. **Biology of Reproduction**. v. 54, p. 60–69, jan. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.1.60>

PENITENTE, J. M. *et al.* Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes. **Animal Science Journal**. v. 86, p. 148–152, 2015. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/19581/artigo.pdf?sequence=1>. <https://doi.org/10.1111/asi.12261>

PINYOPUMMINTR, T. BAVISTER, B.D. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: Effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. **Theriogenology**. v.41, p. 1241-1249. 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90481-W](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90481-W).

PRADEEP, M. A. *et al.* Purification, sequence characterization and effect of goat oviduct-specific glycoprotein on *in vitro* embryo development. **Theriogenology**. v. 75, p.1005-15, abr. de 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X10005868?via%3Dihub>.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.007>

REIS, E. L. **Efeito da dose e do momento da administração de gonadotrofina coriônica eqüina no protocolo de sincronização da ovulação para TETF.**, 2004. 101f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-30012007-161131/publico/EvertonLuizReis.pdf>.

RIZOS, D. *et al.* Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction e Development**. v. 61, n. 02, jan. 2002 Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.1153>.

SAS Institute Inc. 2019. SAS/STAT® 15.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SMITZ, *et al.* Oocyte: *in vitro* maturation. In: Suh CS, Sonntag B, Erickson GF. The ovarian life cycle: a contemporary view. **RevEndocrMetabDisord**, v. 3, p. 5-12, 2004.

STURMEY, R. G. *et al.* Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial lipid association in the porcine oocyte. **Reproduction.**, v.132, p.829-837, 2006. Disponível em:<[https://www.researchgate.net/publication/6670190_Fluorescence_resonance_energy_transfer_analysis_of_mitochondrial Lipid association in the porcine oocyte](https://www.researchgate.net/publication/6670190_Fluorescence_resonance_energy_transfer_analysis_of_mitochondrial_Lipid_association_in_the_porcine_oocyte)>. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0073>

TETZNER, T. A. D. **Efeitos da substituição do soro fetal bovino (SFB) e da albumina sérica bovina (BSA) pela ovalbumina (OVA) na produção *in vitro* de embriões bovinos.** 2007. xxii, 97 f. **Dissertação** (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/98201>.

WRENZYCKI, C. *et al.* Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. **Molecular Reproduction Development**. v. 53, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199905\)53:1<8::AID-MRD2>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199905)53:1<8::AID-MRD2>3.0.CO;2-K). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199905\)53:1<8::AID-MRD2>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199905)53:1<8::AID-MRD2>3.0.CO;2-K)

YANG, X. *et al.* Recombinant Hamster Oviductin Is Biologically Active and Exerts Positive Effects on Sperm Functions and Sperm-Oocyte Binding. **PLoS ONE**, v.10, n.4, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4388664/pdf/pone.0123003.pdf>.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123003>

RESUMOS

COMPORTAMENTO DE LEITÕES EM FASE PÓS-DESMAME COM ENRIQUECIMENTOS AMBIENTAIS	1268
FATORES NÃO GENÉTICOS QUE AFETAM AS CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO EM BOVINOS DA RAÇA NELORE	1269
INCRUSTAÇÃO DE SEMENTES DE UROCHLOA BRIZANTHA CV. MARANDÚ	1270
PRODUÇÃO DE SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR COM INOCULANTES ALTERNATIVOS.....	1271

COMPORTAMENTO DE LEITÕES EM FASE PÓS-DESMAME COM ENRIQUECIMENTOS AMBIENTAIS

RENATA TAVARES LIMA
CLAUDIO DONIZETI DA SILVA JUNIOR

O bem-estar animal (BEA) é um tema de relevância na atualidade com repercussão alta para a população. Vale ressaltar que por meio de pesquisas, artigos científicos e relatos de experiência são conduzidas a importância dos cuidados animais em seu processo produtivo, como sendo um dos principais assuntos no meio. Entre as práticas mais utilizadas do bem-estar animal está o enriquecimento ambiental. Avaliar se o enriquecimento ambiental afeta o comportamento dos leitões na fase pós-desmame. A pesquisa foi realizada na Suinocultura do Centro Zootécnico da UNOESTE, com tratamentos em que se aplicaram brinquedos e distribuídos em duas baias, com 6 leitões híbridos comerciais em cada, todos em fase pós-desmame, recebendo dois tipos de tratamentos: O Tratamento BEG (Bem-Estar com Garrafas), onde foram utilizados brinquedos produzidos a partir de garrafas PET (Polietileno Tereftalato) contendo em seu interior uma bola de plástico e borracha colorida, e o Tratamento BES (Bem-Estar com Som), que recebeu a mesma produção, porém tendo a diferença em seu interior, que possui uma bolinha de plástico contendo um guizo (objeto de metal que produz som). Assim foram observados os comportamentos de cada leitão e descritos em um etograma, e em seguida os dados de cada comportamento são variáveis que foram transformados em frequência, e calculados estatisticamente pelo Teste T-student a 5% para as amostras independentes, com 2 tratamentos e 6 repetições, em que os animais foram as repetições. CEUA Unoeste 7048. Os resultados demonstram que o uso de enriquecimentos ambientais com leitões em fase pós-desmame tem influência positiva sobre o desempenho zootécnico e desenvolvimento produtivo para o animal, e conseqüentemente para o produtor, visto que apresentaram-se diferenças ($p < 0,05$) na ação comendo pelos suínos, além de proporcionar uma melhor qualidade de vida ao garantir o bem-estar animal, refletido nos comportamentos menos agressivos que expressaram como de interação um com o outro brincando com o objeto, e de maior porcentagem ainda, sendo essa quase significativa, dormindo. A partir dos resultados desse estudo, pode-se concluir que o bem-estar animal com enriquecimento ambiental obteve maior desempenho zootécnico e produtivo. O uso de enriquecimento ambiental influencia positivamente no ato de comer dos leitões em fase pós-desmame, o Tratamento BES mostra uma porcentagem maior de consumo de ração, ao comparar-se com o tratamento BEG. Órgão de fomento financiador da pesquisa: UNOESTE Protocolo CEUA: 7048.

FATORES NÃO GENÉTICOS QUE AFETAM AS CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO EM BOVINOS DA RAÇA NELORE

GUSTAVO APARECIDO DE ALMEIDA SANTOS
CAMILLA OLIVEIRA RODRIGUES DA MATA
ANA CLAUDIA AMBIEL AMBIEL CORRAL CAMARGO

O rebanho bovino brasileiro é composto por aproximadamente 188 milhões de cabeças. A pecuária de corte comumente passa por transformações em diversos sentidos, principalmente na seleção animais, a fim de elevar a produção e reprodução nos rebanhos garantindo a competitividade no mercado mundial. Assim, objetivo desse trabalho foi de avaliar os dados registrados em uma fazenda no interior do estado de São Paulo, a fim de avaliar as interferências provocadas pelo ambiente sobre as características de crescimento de animais da raça Nelore. Os dados analisados fazem parte do registro zootécnico de rotina da fazenda Santa Cecília, localizada no município de Tarabai, Oeste Paulista. O arquivo geral é composto por 824 animais, dos quais 408 são machos e 416 fêmeas. Os nascimentos aconteceram entre os meses de agosto a dezembro, em 2018, 2019 e 2020, e o desmame com aproximadamente 225 dias de idade. As avaliações de sobreano foram realizadas nos meses de fevereiro a abril com idade média de 520 dias. Os pesos ao desmame foram ajustados para 210 dias e ao sobreano para 520 dias. Foram realizadas análises de variância pelo método dos quadrados mínimos, estimando a média dos efeitos e o coeficiente de determinação, por meio do comando PROC GLM do software SAS (SAS, 2021) e posteriormente realizado teste de Tukey sob nível de significância de 5%. As variáveis analisadas foram Peso na Desmama (PD), Peso ao Sobreano (PS) e Ganho Médio Diário (GMD). Verificou-se a influencia dos fatores não genéticos, tais como: ano e mês de nascimento, idade ao parto e sexo sobre as características supracitadas. Os resultados mostraram que os machos apresentaram desempenho superior em todas as características de crescimentos avaliadas. Os animais nascidos entre agosto e setembro tiveram menor peso ao nascimento, entretanto melhor desempenho ao se avaliarem PD, que se justifica pela maior disponibilidade de pasto para as mães e conseqüente maior produção de leite. Conclui-se que os fatores ambientais devem ser considerados nas avaliações de desempenho para as características de crescimento. O desempenho superior dos machos fica em evidencia em todas as características de crescimento avaliadas, como esperado. Para produzir animais mais pesados na desmama e ao sobreano é recomendado que os nascimentos ocorram na época que anteceda imediatamente o período das águas. Matrizes adultas naturalmente produzem filhos que sejam superiores no peso ao nascimento, na desmama e ao sobreano.

INCRUSTAÇÃO DE SEMENTES DE UROCHLOA BRIZANTHA CV. MARANDÚ

GABRIEL PATRICIO DOS SANTOS
NEIMAR ROTTA NAGANO
MARIA LETICIA DE LIMA VERAS
RITA DE CÁSSIA LIMA MAZZUCHELLI

No Brasil grande parte das pastagens são formadas por forragens do gênero *Urochloa*. Dentre as variedades, a *Urochloa brizantha* cv. Marandú tem se destacado, devido às características que favorecem seu cultivo e os índices zootécnicos desejados. Diversas técnicas são utilizadas para facilitar o processo de semeadura das pastagens, dentre elas a incrustação de sementes, entretanto, pode dificultar a germinação das sementes, através da barreira física. O objetivo deste trabalho foi de avaliar a germinação em sementes de *Urochloa brizantha* cv. Marandú, incrustadas e não incrustadas. O experimento foi realizado no Laboratório de Análise de Sementes da Sementes do Oeste Paulista (Soesp), localizada no município de Presidente Prudente, São Paulo. Para desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas amostras de sementes da espécie *Urochloa brizantha* cv. Marandú, que por sua vez foram subdivididas em dois tratamentos, com doze repetições por tratamento. O tratamento um (T1) foi composto por sementes encrustadas, classificadas como sementes advanced; e o tratamento dois (T2), pertencentes às sementes sem incrustamento, classificadas como sementes nua. Para a pesquisa, as variáveis avaliadas foram: germinação (%), anormais (%) e mortas (%) nos tratamentos com e sem incrustação, obtidas no teste de germinação. Os dados foram submetidos a análise de variância e posteriormente as médias foram comparadas pelo teste Tukey com nível de significância de 5%. No tratamento realizado com as sementes incrustadas, a quantidade de sementes germinadas foi de 84,75% do total avaliado, enquanto que no tratamento ao qual não houve revestimento das sementes a porcentagem de germinação foi de 79,75% de sementes. A quantidade de sementes anormais foi maior no tratamento com incrustação, com 2,25% sementes em média e sem incrustação foi de 0,75%. As sementes mortas, apresentaram valores de 5,75% para o tratamento com as sementes incrustadas, nas sementes que não receberam incrustação os valores foram em média 11,75% de sementes. A incrustação proporcionou melhorias na germinação e redução de sementes mortas de *Urochloa brizantha* cv. Marandú.

PRODUÇÃO DE SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR COM INOCULANTES ALTERNATIVOS

RENAN KAIQUE BARRETO MARQUES
CAROLINE MAYUME NAKASSONI DE OLIVEIRA
MARIA LETICIA DE LIMA VERAS
NEIMAR ROTTA NAGANO
RITA DE CÁSSIA LIMA MAZZUCHELLI

A cana-de-açúcar é uma forrageira com grande potencial produtivo. Sua utilização como silagem traz vantagens quanto a redução da mão-de-obra diária para o corte da espécie, ausência de senescência, diminuição do risco de geadas e incêndio, além da liberação da área. Porém, a ensilagem requer cuidados, visto a fermentação alcoólica é comum nesta matéria-prima. O uso de aditivos no processo de ensilagem traz como benefício melhorar a fermentação no processo, além de proporcionar o desenvolvimento de microrganismos benéficos no material ensilado. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a composição nutricional da silagem de cana-de-açúcar utilizando inoculantes alternativos. o experimento foi desenvolvido no sítio Boa Vista situado no município de Teodoro Sampaio, estado de São Paulo. A variedade usada foi a BR867515 com 18 meses de implantação. O trabalho foi desenvolvido sob cinco tratamentos: uso de inoculante comercial com dosagem recomendada pelo fabricante; uso de cal hidratada a 1%; leite fermentado a 2%; uso de ureia; e tratamento controle, sem utilização de inoculantes. Foram aplicados delineamento inteiramente casualizados (DIC), com cinco tratamentos e cinco repetições. O material foi picado, homogeneizado, adicionado os respectivos tratamentos e destinado ao preenchimento de "bags", com 1 m de largura, por 3 m de comprimento, que acomodaram cerca de 3m³ do material, que foi devidamente compactado e vedado, colocados em local de piso cimentado. Após 60 dias da realização dos tratamentos e fechamento dos bags, os mesmos foram abertos, e encaminhados para análises bromatológicas. Os dados foram submetidos a análise de variância e posteriormente as médias foram comparadas pelo teste Tukey com nível de significância de 5%. Após a análise dos dados foi possível observar que a M.S.% apresentou melhores níveis no tratamento controle e na inoculação com a cal. Para M.M.% os o uso de inoculante comercial e a cal foram superiores aos demais tratamentos. Já para P.B. a ureia apresentou índices elevados e, por fim, não foram observadas diferenças nas variáveis FDA e FDN. O uso da ureia possibilitou melhorias nos teores de proteína bruta da silagem, podendo ser uma escolha importante ao produtor no momento da ensilagem.