



XVII SICTI
Seminário de Iniciação Científica,
Tecnológica e Inovação
X SIMIT
Simpósio de Inovação Tecnológica

**CIÊNCIA e
COOPERAÇÃO
na AMAZÔNIA**

**16 a 19 de
Setembro**

IFPA Campus Bragança

FECUNDAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BUBALINOS NA PRESENÇA DE FRAGMENTOS DE *CUMULUS OOPHORUS* BOVINO

ANA RAFAELA RODRIGUES MARQUES¹, JOÃO VICTOR BARBOSA DA SILVA², BRUNO PORPINO HOMOBONO³, MATEUS RAMOS TRINDADE³, MARCELA DA SILVA CORDEIRO⁴

¹Acadêmica do Curso Integrado em Meio Ambiente, Bolsista PIBICTI/PROPPG/IFPA/CNPq, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará - *Campus Ananindeua*

²Acadêmico do Curso Integrado em Informática, Bolsista PIBICTI/PROPPG/IFPA/CNPq, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará - *Campus Ananindeua*

³Laboratório de Fertilização *In Vitro* Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi, ICB- Universidade Federal do Pará

⁴Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará - *Campus Ananindeua*. E-mail autor correspondente: ana2rafaela3@gmail.com

Área de conhecimento/Subárea: Área 05 – Ciências Agrárias / Zootecnia
ODS vinculado(s): ODS 02 - Fome zero e agricultura sustentável

RESUMO: As células do *cumulus oophorus* (CO) desempenham importante papel durante os processos de maturação oocitária e fecundação pela produção de substâncias que protegem os gametas do estresse do cultivo celular *in vitro*. No entanto uma característica comum aos gametas feminos de bubalinos é a quantidade reduzidas de células CO quando comparados ao bovinos. Nesse sentido o objetivo deste estudo foi a realização do processo de fecundação *in vitro* na presença de fragmentos de CO bovinos visando o fornecimento de condições de cultivo mais adequadas a essa etapa. Houve diferença nas taxas de clivagem entre os Grupos FIV Controle ($65,14 \pm 9,71$) e FIV Cumulus ($74,07 \pm 13,65$). Já em relação a taxa de formação de blastocisto não houve diferença entre os Grupos FIV Controle ($32,71 \pm 14,38$) e FIV Cumulus ($38,03 \pm 12,05$). As células do *cumulus oophorus* foram capazes de melhorar a taxa de fecundação *in vitro* em bubalinos, no entanto não influenciaram na formação do blastocisto.

PALAVRAS-CHAVE: Búfalos; PIVE; células do *cumulus oophorus* bovino

INTRODUÇÃO

O rebanho bubalino brasileiro é o maior fora do continente asiático, com aproximadamente 1,672 milhão de cabeças em 2023 (IBGE, 2023) e o estado do Pará concentra cerca de 750 mil animais (Oliveira, 2023). Apesar desse destaque, a produtividade do rebanho ainda enfrenta desafios, especialmente no que se refere à produção de leite e carne, e ao melhoramento genético dos animais. Nesse cenário, a biotecnologia da Produção *in vitro* de embriões (PIVE) emerge como uma importante ferramenta para a multiplicação genética de animais de alto valor genético. A PIVE consiste em três etapas principais: maturação *in vitro* (MIV) dos complexos cúmulo-oócito (CCOs), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo embrionário *in vitro* (CIV) até o estágio de blastocisto (Mello *et al.*, 2016).

Embora a PIVE seja amplamente consolidada em bovinos, sua aplicação em bubalinos ainda apresenta taxas de produção de embriões inferiores (Boccia *et al.*, 2013). A dificuldade em replicar, *in vitro*, o microambiente adequado para maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário é um dos maiores obstáculos, devido ao conhecimento ainda limitado sobre as exigências metabólicas específicas dessa espécie (Marin *et al.*, 2019).

Por outro lado, o reduzido número de complexos *cumulus* oócitos (CCOs) obtidos por aspiração folicular e, principalmente, a qualidade desses gametas (Ohashi *et al.*, 2017) dificultam maiores avanços a nível de pesquisa básica e aplicada. Uma característica importante é que a maioria dos CCOs de bubalinos aspirados apresentam-se envolvidos por um número bem menor de células de *cumulus oophorus* quando comparados aos CCOs de bovinos e essa característica pode ser um dos fares limitantes sob condições *in vitro*, uma vez que está relacionado diretamente com a menor taxa de clivagem e formação de blastocisto observadas (Jeena *et al.*, 2020; Jeena *et al.*, 2022).

Sabemos que as células do *cumulus oophorus* são fundamentais para a promoção adequada dos processos de maturação, ovulação e fecundação (Ávila, 2017; Batistela *et al.*, 2023), e que ao criar um microambiente complexo de secreções e produtos metabólicos ao redor do oócito, favorece a seleção



XVII SICTI

Seminário de Iniciação Científica,
Tecnológica e Inovação

X SIMIT

Simpósio de Inovação Tecnológica

CIÊNCIA e
COOPERAÇÃO
na AMAZÔNIA

16 a 19 de
Setembro

IFPA Campus Bragança

e capacitação espermática (Kato *et al.*, 2022; Keeble *et al.*, 2021; Luongo *et al.*, 2023) garantindo o sucesso da fecundação. Nesse sentido esse estudo propõe a realização do processo de fecundação *in vitro* na presença de biópsias de *cumulus oophorus* bovinos visando o fornecimento de condições de cultivo mais adequadas a essa etapa da PIVE em bubalinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste experimento a fecundação *in vitro* foi realizada de acordo com os seguintes grupos experimentais: **FIV Controle** (fecundação sem a presença de biópsias de *cumulus oophorus* bovinos maturadas) e **FIV Cumulus** (fecundação na presença de biópsias de *cumulus oophorus* bovinos maturadas). Foram realizadas 10 repetições totalizando 261 complexos *cumulus*-oócitos (CCOs), sendo 107 no grupo FIV Controle e 154 no grupo FIV Cumulus.

COLETA DOS OVÁRIOS E SELEÇÃO DOS COMPLEXOS *CUMULUS*-OÓCITOS

Este experimento, por ser realizado exclusivamente com material proveniente de abatedouro, não necessitou de aprovação em comitê de ética no uso de animais. Ovários bovinos e bubalinos foram obtidos em abatedouro frigorífico local. Folículos ovarianos antrais bovinos e bubalinos de 2 a 8 mm foram puncionados utilizando-se agulhas 40 x 12 e seringas de 10 mL, sendo o fluido folicular obtido depositado em tubos de 15 mL. O rastreamento dos CCOs foi realizado com auxílio de lupa estereomicroscópica. Os CCOs com citoplasma homogêneo, sem vacúolos ou grânulos escurecidos e que apresentam células do *cumulus oophorus* compactas e refringentes (LEIBFRIED & FIRST, 1979) foram selecionados e lavados em Meio 199 acrescido 10% de SFB e antibióticos.

Para obtenção dos fragmentos de *cumulus oophorus* os CCOs bovinos selecionados foram submetidos a processo de separação do oócito pela secção manual com auxílio de um micro hematócrito.

MATURAÇÃO, FECUNDAÇÃO E CULTIVO EMBRIONÁRIO *IN VITRO*

Os CCOs bubalinos e os fragmentos de *cumulus oophorus* bovino foram incubados em placas de Petri com gotas de 100 µL (10 a 12 CCOs ou biópsias por gota) sub óleo mineral estéril, em meio de MIV (Meio 199 suplementado com 10% de SFB, 0,5 µg/mL de FSH, 5 UI/mL de hCG, 22 µg/mL de piruvato, 6 mg/mL de BSA e 50 µg/mL de gentamicina. Foram mantidos em estufa de cultivo com 5% de CO₂, 20% de O₂ e 75% de N₂ sob atmosfera úmida e temperatura de 38,5°C por um período de 22 horas.

Para a fecundação espermatozoides (2×10^6 spz/mL) de um único touro selecionados pelo gradiente descontínuo de Percoll foram co-incubados com 20 CCOs na presença ou ausência das biópsias de *cumulus* maduros. Esta incubação ocorreu em gotas de 100 µL do meio de *Tyrod's albumin lactate pyruvate* (TALP) segundo Parrish *et al.*, 1988, sob as mesmas condições já descritas para a MIV.

Para dar suporte ao desenvolvimento embrionário foi utilizado um sistema de co-cultivo dos embriões sobre monocamada células do *cumulus oophorus* que aderiram a placa durante a MIV. Para isso a placa pós MIV teve seu meio substituído por 100µL de Synthetic Oviductal Fluid segundo Holm *et al.*, 1999. Após 28h de FIV os prováveis zigotos foram submetidos a sucessivas pipetagens para remoção das células do *cumulus oophorus* e transferidos para as gotas de cultivo onde permaneceram por 8 dias, sob as mesmas condições de cultivo citadas para a MIV e FIV.

AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E EXPRESSÃO GÊNICA

O desenvolvimento embrionário foi avaliado com auxílio de estereomicroscópio, de acordo com as taxas de clivagem (dia 2) e formação de blastocisto (dia 7) de acordo com os critérios estabelecidos



XVII SICTI

Seminário de Iniciação Científica,
Tecnológica e Inovação

X SIMIT

Simpósio de Inovação Tecnológica

CIÊNCIA e
COOPERAÇÃO
na AMAZÔNIA

16 a 19 de
Setembro

IFPA Campus Bragança

pelo manual da sociedade internacional de transferência de embriões (Stringfellow & Seidel, 1999).

Para avaliação da expressão gênica no sétimo dia de cultivo os blastocistos eclodidos dos grupos experimentais foram armazenados em 10 μ L de RNA later® e armazenados em freezer a -20°C . A amplificação dos genes foi realizada usando a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qrt-PCR) com a assistência do software StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e o kit comercial SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems). Foram obtidas três réplicas biológicas para cada grupo, com as amostras sendo amplificadas individualmente em triplicatas. A análise de expressão gênica foi realizada usando o método de cálculo $\Delta\Delta\text{Ct}$.

Foram avaliados qualitativamente em relação à expressão de genes importantes para o desenvolvimento embrionário: Octâmero 4 (OCT4), Regulador apoptótico BAX (BAX), Superóxido desmutase 2 (SOD2), Fator de transcrição A mitocondrial e o Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e Beta actina (ACTB) que foram utilizados como controles endógeno.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas 10 repetições totalizando 261 complexos *cumulus* oócitos (CCOs) bubalinos distribuídos entre os Grupos FIV Controle (107) e FIV Cumulus (154). Houve diferença nas taxas de clivagem entre os Grupos FIV Controle ($65,14 \pm 9,71$) e FIV Cumulus ($74,07 \pm 13,65$). Já em relação a taxa de formação de blastocisto não houve diferença entre os Grupos FIV Controle ($32,71 \pm 14,38$) e FIV Cumulus ($38,03 \pm 12,05$) como descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Taxas de clivagem (dia 2) e formação de blastocisto (dia7) bubalino após fecundação na presença de biópsias de *cumulus oophorus* maduros (média \pm desvio padrão).

	n	% Clivagem	% Blastocisto
FIV Controle	107	$65,14 \pm 9,71^b$	$32,71 \pm 14,38^a$
FIV Cumulus	154	$74,07 \pm 13,65^a$	$38,03 \pm 12,05^a$

^{a,b} Sobrescritos diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Em relação a avaliação da expressão gências, os equipamentos estão em manutenção e as amostras serão processadas em outro laboratório, entretanto ainda estão sendo realizados alguns ajustes o que impossibilitou sua avaliação até o momento. Acredito que as avaliações e análises serão sanadas em duas semanas. Tão logo seja possível irei solicitar a troca deste arquivo para o com as avaliações completas. Grata pela compreensão.

CONCLUSÃO

As células do *cumulus oophorus* foram capazes de melhorar a taxa de fecundação *in vitro* em bubalinos, no entanto não influenciaram na formação dos blastocisto.

AGRADECIMENTOS

À PROPPG pelo suporte financeiro via EDITAL n. 05/2024 -PIBICTI/PROPPG/IFPA/CNPq. Ao Laboratório de Fertilização *In Vitro* Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, pela disponibilização do espaço e materiais necessários para a realização dos experimentos.

Referências

ÁVILA, I. M. A. De. Efeito de um meio condicionado por células do Cumulus oophorus de bovinos na maturação e no potencial de



XVII SICTI

Seminário de Iniciação Científica,
Tecnológica e Inovação

X SIMIT

Simpósio de Inovação Tecnológica

CIÊNCIA e
COOPERAÇÃO
na AMAZÔNIA

16 a 19 de
Setembro

IFPA Campus Bragança

desenvolvimento embrionário in vitro de oócitos desnudos, 2017. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

BATISTELA, M. V. V. et al. Produção in vitro de embriões e novas estratégias na produção de oócitos em bovinos. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, v. 20, n. 46, 2023. Disponível em: <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2023D/producao.pdf>. Acesso em: 24 abr. 2025.

BOCCIA L. et al. Osteopontin improves sperm capacitation and *in vitro* fertilization efficiency in buffalo (*Bubalus bubalis*). Theriogenology, 80(3): 212–217, 2013.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Produção Agropecuária, 2023 | IBGE. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/>. Acesso em: 24 abr. 2025.

HOLM, P. et al. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. Theriogenology. Sep; 52(4): 683-700, 1999.

JEENA et al. Effect of cumulus cells of cumulus-oocyte complexes on *in vitro* maturation, embryonic developmental and expression pattern of apoptotic genes after *in vitro* fertilization in water buffalo (*Bubalus bubalis*). Animal Biotechnology. Apr;31(2):135-141, 2020.

JEENA et al. Transcriptional profile of cumulus associated GJA1, PTX3, PRSS35, and SERPINE2 genes with oocytes and embryonic development in water buffalo. Molecular Biology Reports. Jul;49(7):6285-6293, 2022.

KATO et al. Y. The secretion and metabolism of cumulus cells support fertilization in the bovine model. Theriogenology. Nov;193:136-145, 2022.

KEEBLE et al. Evolutionary, proteomic, and experimental investigations suggest the extracellular matrix of cumulus cells mediates fertilization outcomes†. Biology of Reproduction. Oct 11;105(4):1043-1055, 2021.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. Factors determining competence of in vitro produced cattle embryos. Theriogenology, 51:473-485, 1999.

LUONGO et al. Exposure to Cumulus Cell Secretome Improves Sperm Function: New Perspectives for Sperm Selection In Vitro. Cells. Sep 25;12(19):2349, 2023.

MARIN, D. F. D. et al. In vitro embryo production in buffaloes: from the laboratory to the farm. Animal Reproduction, v.16, n.2, p.260-266, 2019.

MELLO. R. R. C. et al. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.40, n.2, p.58-64, 2016.

OLIVEIRA, M. Estado do Pará detém o maior rebanho de búfalos do Brasil e o 2º maior rebanho bovino, Agência Pará, 2023. Disponível em: <https://agenciapara.com.br/noticia/40823/estado-do-para-detem-o-maior-rebanho-de-bufalos-do-brasil-e-o-2-maior-rebanho-bovino>. Acesso em: 24 abr. 2025.

OHASHI, O. M. et al. Produção in vitro de embrião (PIVE) na espécie bubalina. Ver. Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.195-200, 2017.

PARRISH, J.J. et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol Reprod. Jun;38 (5): 1171-80, 1988.

ROCHA, E.; CAMARGO, L. S. A. Produção in vitro de embriões bovinos, clonagem animal e apoptose. 2021. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1134682/1/Producao-in-vitro.pdf>. Acesso em: 25 abr. 2025.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. Um guia de procedimento e informação geral para o uso da tecnologia de transferência de embriões, enfatizando precauções sanitárias. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. Terceira Edição, 1999.