



AVALIAÇÃO DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO BOVINO COMO SUBSTITUTO AO SORO FETAL BOVINO NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINA

Maria Eduarda Gonzaga Nascimento¹, Júlia Beatriz Costa de Oliveira², Isabele Picada Emanuelli³

Acadêmica do Curso de Biomedicina, Campus Maringá-PR, Universidade Cesumar - UNICESUMAR. Bolsista PIBIC/ICETI- UniCesumar. duda07gonzaga@gmail.com

Mestranda do Programa de Tecnologias Limpas, UNICESUMAR. Bolsista Fundação Araucária – UniCesumar. jubia.oliveira15@gmail.com

Docente no Curso de Medicina Veterinária, UNICESUMAR. Pesquisadora do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI. isabele.emanuelli@unicesumar.edu.br

RESUMO

A produção in vitro (PIV) de embriões bovinos é uma biotecnologia amplamente consolidada na pecuária moderna, com aplicação crescente na multiplicação genética de animais de alto valor zootécnico. No entanto, um dos principais limitantes à eficiência do sistema PIV ainda está relacionado à composição dos meios de cultivo e maturação, especialmente pela presença de fontes não definidas como o soro fetal bovino (SFB). Apesar de amplamente utilizado, o SFB apresenta alta variabilidade entre lotes, além de ser rico em lipídeos, o que pode favorecer o acúmulo citoplasmático lipídico nos embriões. Essa característica está diretamente associada à redução da qualidade embrionária, especialmente no que diz respeito à tolerância ao congelamento e subsequente taxa de sobrevivência após descongelamento. Nesse contexto, o líquido cefalorraquidiano (LCR) bovino surge como uma alternativa promissora, por apresentar composição mais simples, baixa concentração lipídica e disponibilidade técnica e sanitária para coleta em abatedouros. O presente estudo propõe investigar a viabilidade do uso do LCR como substituto ao SFB nos meios de maturação e cultivo in vitro de embriões bovinos. A metodologia consiste em dois experimentos laboratoriais de PIV. No primeiro, o LCR será testado nos meios de maturação; no segundo, nos meios de cultivo. Serão comparadas três concentrações de LCR (2,5%, 5% e 10%) com grupos controle contendo as mesmas proporções de SFB. Oócitos bovinos serão coletados em abatedouro e submetidos às etapas de maturação, fecundação e cultivo em laboratório. As taxas de clivagem (D2), blastocisto (D7) e eclosão (D9) serão avaliadas. Espera-se que o uso do LCR contribua para a redução do conteúdo lipídico citoplasmático, melhoria da qualidade embrionária e maior eficiência do processo de criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro.

PALAVRAS-CHAVE: Bovino; Criopreservação embrionária; Produção de embriões in vitro; Suplementação proteica.

1 INTRODUÇÃO

A PIV de embriões é uma biotecnologia consolidada na pecuária, com impacto direto na multiplicação de animais de alto mérito genético, acelerando o melhoramento e reduzindo o intervalo de gerações (EUCLIDES FILHO; EUCLIDES, 2010; VIANA, 2012). Essa técnica, composta pelas etapas de maturação in vitro (MIV), fecundação in vitro (FIV) e cultivo in vitro (CIV), apresenta taxas médias de 30 a 40% de blastocistos (LONERGAN; FAIR, 2008). Entretanto, ainda enfrenta limitações, como o descarte de cerca de 20% dos embriões devido à baixa criotolerância, reflexo de diferenças metabólicas e do acúmulo lipídico em embriões produzidos in vitro (SEIDEL, 2006; DEL COLLADO et al., 2015).

Embora protocolos usuais de criopreservação, como congelamento lento e vitrificação, apresentem bons resultados em embriões produzidos in vivo, sua eficácia é reduzida em embriões PIV, reforçando a necessidade de alternativas que minimizem a sensibilidade ao resfriamento (DODE; LEME; SPRICIGO, 2013; ABE; MATSUZAKI; HOSHI, 2002). Nesse contexto, surgiram estratégias como o uso de reguladores



metabólicos (SUDANO et al., 2011; PASCHOAL et al., 2014; LEÃO et al., 2015; HELD-HOELKER et al., 2017), buscando reduzir o acúmulo lipídico e melhorar a qualidade embrionária.

Nos protocolos de PIV, o SFB é o suplemento proteico mais utilizado, fornecendo nutrientes e fatores de crescimento. Contudo, sua composição indefinida e rica em lipídeos compromete a padronização e a criopreservação (BARCELÓ-FIMBRES; SEIDEL, 2011). Como alternativa, o LCR bovino apresenta composição mais simples, baixa concentração lipídica e já demonstrou compatibilidade com o crescimento celular e atividade biológica relevante (GRADWELL; SYMINGTON, 1975; VERA et al., 2013; CLIVER et al., 2021). Além disso, pode ser coletado de forma viável e segura em frigoríficos sob inspeção sanitária.

Apesar do potencial, não há registros sobre o uso do LCR como suplemento em MIV ou CIV. Assim, este estudo se propõe a investigar, de forma pioneira, seus efeitos sobre as taxas de clivagem, formação de blastocisto e eclosão, buscando validar sua aplicação como alternativa ao SFB e contribuir para protocolos mais padronizados, eficientes e sustentáveis na biotecnologia reprodutiva.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo será conduzido como um ensaio laboratorial experimental, com o objetivo de avaliar o uso do LCR bovino como substituto ao SFB nos meios de MIV e CIV. A pesquisa será realizada no Laboratório de Reprodução Animal da Fazenda Escola – BIOTEC (UNICESUMAR), em condições controladas, utilizando insumos certificados e rastreados. O LCR será coletado em abatedouros sob inspeção sanitária, de forma asséptica, aliquotado e armazenado até o uso, sendo parte reservado para análise bioquímica.

Serão realizados dois experimentos independentes. No primeiro, o LCR substituirá o SFB durante a MIV dos complexos cumulus-oócito (COCs), que após a maturação seguirão para FIV e cultivo em meio padrão. No segundo, os COCs serão maturados em meio padrão e, após a FIV, os zigotos serão cultivados em meios suplementados com diferentes concentrações de LCR em substituição ao SFB.

Cada experimento contará com seis grupos experimentais, sendo três suplementados com LCR (2,5%, 5% e 10%) e três controles com as mesmas concentrações de SFB. O delineamento será em blocos ao acaso, com repetições independentes a partir de ovários coletados no mesmo dia.

As variáveis analisadas incluirão taxas de clivagem (D2), formação de blastocisto (D7) e eclosão (D9), além da morfologia embrionária. A produção *in vitro* seguirá protocolos padronizados de manipulação de ovários, seleção de oócitos, MIV, FIV e CIV, utilizando meios e reagentes comerciais certificados. O sêmen de touro Nelore será preparado por gradiente de Percoll e ajustado para inseminação *in vitro*.

Os dados obtidos serão expressos em porcentagem e analisados por ANOVA em delineamento fatorial 3 × 2 (concentrações × tipo de suplemento), considerando blocos ao acaso. Diferenças significativas serão avaliadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), com análises feitas separadamente para cada experimento. Além das taxas embrionárias, será investigada a composição bioquímica do LCR quanto a proteínas, lipídeos, glicose, ureia e eletrólitos, buscando compreender seu potencial como substituto ao SFB.

3 RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se que o uso do LCR nos meios de MIV e CIV resulte em taxas de clivagem, blastocisto e eclosão similares ou superiores às observadas nos grupos



suplementados com SFB. Além disso, espera-se que o LCR apresente composição bioquímica compatível com o desenvolvimento embrionário, especialmente por sua baixa concentração de lipídeos e maior estabilidade entre amostras. Ao final do estudo, resultados positivos poderão justificar novos experimentos voltados à avaliação da eficácia da criopreservação dos embriões produzidos com LCR, contribuindo para o aprimoramento dos protocolos de PIV e para alternativas mais sustentáveis e padronizadas na biotecnologia reprodutiva.

REFERÊNCIAS

ABE, H.; MATSUZAKI, S.; HOSHI, H. Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. *Theriogenology*, v. 57, n. 1, p. 83–1273, 2002.

ALMIÑANA, C.; CUELLO, C. What is new in the cryopreservation of embryos. *Animal Reproduction*, v. 12, n. 3, p. 418–427, 2015.

BARCELÓ-FIMBRES, M.; SEIDEL, G. E. Cross-validation of techniques for measuring lipid content of bovine oocytes and blastocysts. *Theriogenology*, v. 75, n. 1, p. 434–444, 2011.

BLONDIN, P. Status of embryo production in the world. *Animal Reproduction*, v. 12, n. 3, p. 356–358, 2015.

BORLACHENCO, N. G. C.; GONÇALVES, A. B. Expansão agrícola: elaboração de indicadores de sustentabilidade nas cadeias produtivas de Mato Grosso do Sul. *Interações*, v. 18, n. 1, p. 119–128, 2017.

CARRO, M. et al. Linoleic acid stimulates neutral lipid accumulation in lipid droplets of maturing bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 79, n. 1, p. 687–694, 2013.

CARVALHO, T. B.; ZEN, S. Cadeia de pecuária de corte: perspectivas de produção e consumo no Brasil. In: CONGRESSO SOBER, 2010. Anais...

CLIVER, R. N.; AYERS, B.; BRADY, A.; FIRESTEIN, B. L.; VAZQUEZ, M. Cerebrospinal fluid replacement solutions promote neuroglia migratory behaviors and spinal explant outgrowth in microfluidic culture. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 15, n. 2, p. 176–188, 2021. DOI: 10.1002/term.3164.

DEL COLLADO, M. et al. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 28, n. 1, p. 1721–1732, 2015.

DODE, M. A. N.; LEME, L. O.; SPRICIGO, J. F. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 37, n. 2, p. 145–150, 2013.

EUCLIDES FILHO, K.; EUCLIDES, V. P. B. Desenvolvimento recente da pecuária de corte brasileira e suas perspectivas. *Bovinocultura de Corte*, v. 1, n. 1, p. 11–38, 2010.



GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. Maturing the bovine oocyte. 2003. v. 2, n. 1, p. 112–157.

GRADWELL, P. B.; SYMINGTON, R. B. The effect of inclusion of cerebrospinal fluid in the incubation medium on the in vitro secretion of luteinizing hormone from the bovine adenohypophysis. South African Journal of Medical Sciences, v. 40, n. 3, p. 83–89, 1975. PMID: 1198207.

HELD-HOELKER, E. et al. Effects of L-carnitine supplementation during in vitro maturation of bovine oocytes on embryo development and cryotolerance. Theriogenology, v. 87, p. 305–313, 2017.

LEÃO, B. C. S. et al. Improved embryonic cryosurvival observed after in vitro supplementation with conjugated linoleic acid is related to changes in the membrane lipid profile. Theriogenology, v. 84, n. 1, p. 127–136, 2015.

LEIBO, S. P.; LOSKUTOFF, M. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. Theriogenology, v. 39, n. 1, p. 81–94, 1993.

LONERGAN, P.; FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos—dealing with the warts. Theriogenology, v. 69, n. 1, p. 17–22, 2008.

MACHATY, Z.; PEIPPO, J.; PETER, S. Production and manipulation of bovine embryo: techniques and terminology. Theriogenology, v. 78, n. 1, p. 937–950, 2012.

MORESKI, D. A. B. et al. Conceitos e métodos de criopreservação e criotolerância de embriões bovinos in vitro. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR, 10, 2017. Anais...

PARADA, C. et al. Embryonic cerebrospinal fluid collaborates with the isthmus organizer to regulate mesencephalic gene expression. Journal of Neuroscience Research, v. 82, n. 3, p. 333–345, 2005. DOI: 10.1002/jnr.20618.

PASCHOAL, D. M. et al. Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. Zygote, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2014.

PERRY, G. Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Embryo Transfer Newsletter, v. 33, n. 1, p. 14–26, 2015.

ROMÃO, R. et al. Cryopreservation of in vitro produced sheep embryos: effect of different protocols of lipid reduction. Theriogenology, v. 84, n. 1, p. 118–126, 2015.

SEIDEL, G. E. Jr. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. Theriogenology, v. 65, n. 1, p. 235–228, 2006.

SUDANO, M. J. et al. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos. Theriogenology, v. 5, n. 1, p. 1211–1220, 2011.

VERA, A. et al. SCO-spondin from embryonic cerebrospinal fluid is required for neurogenesis during early brain development. Frontiers in Cellular Neuroscience, v. 7, p. 80, 2013. DOI: 10.3389/fncel.2013.00080.



VIANA, J. H. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. *O Embrião*, v. 51, n. 1, p. 6–10, 2012.