

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
BOVINOS INCLUSOS EM TECIDOS OVARIANOS CULTIVADOS *IN*
VITRO POR MEIO DO CORANTE *NEUTRAL RED***

Gabrielle de Oliveira Ximenes (gabiximenes14@gmail.com)

Andreza de Aguiar Silva (andrezabiomedicina93@gmail.com)

Matheus Andrade Chaves (matheus.chaves@usp.br)

Francisco André Medeiros Moita (franciscoandremoita@gmail.com)

Helcio Silva dos Santos (helciodossantos@gmail.com)

Juliano Coelho da Silveira (julianodasilveira@usp.br)

José Roberto Viana Silva (roberto_viana@yahoo.com)

Introdução: O cultivo *in vitro* de tecido ovariano bovino pode ser realizado por até 6 dias, sendo os fragmentos posteriormente processados por técnicas histológicas. No entanto, esse processamento pode comprometer a integridade do tecido, restringindo a análise à morfologia e reduzindo a confiabilidade na avaliação da viabilidade folicular. Diante dessa limitação, a utilização do corante Vermelho neutro (*Neutral Red*), surge como uma alternativa não invasiva e promissora para a avaliação da viabilidade tecidual. O corante permite identificar os folículos viáveis durante o cultivo, pois se acumula preferencialmente em organelas como os lisossomos, em função da sua afinidade por estruturas lipídicas ativas. Essa coloração possibilita o monitoramento da integridade celular ao longo do período de cultivo. Com isso, aumentando a precisão das análises e reduzindo a dependência do processamento histológico tradicional.

Objetivo: Avaliar os diferentes tempos de incubação (30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas e 4 horas) com o corante *Neutral Red* para padronizar um protocolo eficaz para a avaliação da viabilidade dos folículos inclusos no tecido ovariano bovino cultivados *in vitro*.

Métodos: Os fragmentos de tecido ovariano bovino foram padronizados com tamanho aproximado de 1,5mmx0,5mm e cultivados em poços de 300µL de meio α-MEM suplementado com BSA, (1,25 mg/mL) glutamina (2mM), hipoxantina (2mM), penicilina/estreptomicina (100 µg/mL), insulina (10 µg/mL), transferrina (5,5 µg/mL), selênio (10 µg/mL). Em seguida, foi adicionado corante *Neutral Red*, na concentração

de 50 µg. Após a adição do corante, os fragmentos foram analisados em microscópio invertido nos seguintes intervalos de tempo: 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas e 4 horas. Posteriormente, os fragmentos foram incubados com Hoechst incubados por 15 minutos e analisados em microscópio confocal Mica Widefield Live Cell. Usando a objetiva de 10x para identificação dos folículos viáveis por fluorescência em todo o tecido, e a objetiva de 63x para observação detalhada das estruturas foliculares presentes no tecido. **Resultados:** Após cada intervalo de cada tempo, os fragmentos foram analisados. No período de 30 minutos a 1 hora, foi observado uma marcação muito fraca das células dos folículos viáveis presentes no tecido. No período de 2 horas, houve um aumento na intensidade da marcação desses folículos, porém, somente entre 3 e 4 horas a marcação tornou-se mais evidente e confiável para a avaliação da viabilidade celular utilizando o microscópio confocal Mica Widefield Live Cell. **Conclusões:** As análises indicaram que o intervalo de 4 horas de exposição ao *Neutral Red* proporciona melhor coloração dos folículos pré-antrais iniciais, facilitando a identificação dos folículos viáveis presentes no tecido. Assim, contribuindo para a padronização de um protocolo de avaliação da viabilidade dos folículos inclusos no tecido ovariano bovino cultivados *in vitro*.

Palavras-chave: *Neutral Red*. Tecido. Foliculo.