



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**

THIAGO VICTOR DAMASCENO TEIXEIRA

**BIOTÉCNICAS RELACIONADAS AO CONTROLE DA REPRODUÇÃO: CULTIVO
DE FIBROBLASTOS E FECUNDAÇÃO *IN VITRO***

FORTALEZA

2016

THIAGO VICTOR DAMASCENO TEIXEIRA

BIOTÉCNICAS RELACIONADAS AO CONTROLE DA REPRODUÇÃO: CULTIVO DE
FIBROBLASTOS E FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

Relatório apresentado à Coordenação do Curso de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências da disciplina Estágio Curricular Obrigatório.

Orientadores:

Prof. Dr. Arlindo Alencar Araripe Moura

Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T27b Teixeira, Thiago Victor Damasceno.
Biotécnicas relacionadas ao controle da reprodução: Cultivo de fibroblastos e Fecundação in vitro /
Thiago Victor Damasceno Teixeira. – 2016.
37 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências
Agrárias, Curso de Zootecnia, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Arlindo Alencar Araripe Moura.

1. Reprodução animal. 2. Embrião bovino. 3. Fibroblastos. I. Título.

CDD 636.08

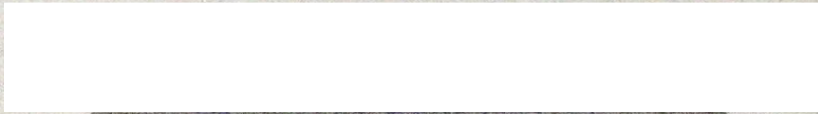
THIAGO VICTOR DAMASCENO TEIXEIRA


BIOTÉCNICAS RELACIONADAS AO CONTROLE DA REPRODUÇÃO: CULTIVO DE
FIBROBLASTOS E FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

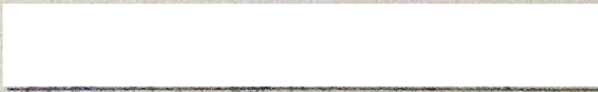
Relatório apresentado à Coordenação do Curso
de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias
da Universidade Federal do Ceará, como parte
das exigências da disciplina Estágio Curricular
Obrigatório.

Aprovada em: 30/11/2016.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Prof. Dr. Airton Alencar Araújo (Conselheiro)
Universidade Federal do Ceará (UFC)


M.Sc. Aderson Martins Viana Neto
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que não me desamparou em nenhum momento da minha jornada acadêmica e a Nossa Senhora de Fátima, que intercedeu por mim diante de seu filho nos momentos mais difíceis.

À minha família que sempre esteve ao meu lado, que apesar das dificuldades, sempre lutou e perseverou comigo. Agradecer, em especial, a minha mãe que com sua fibra e moral, foi meu exemplo vivo de perseverança, coragem e fé. Amo vocês incondicionalmente.

Ao meu namorado Edmund, que nos últimos anos tem sido um grande companheiro, me apoiando e aconselhando sempre que necessário. Te amo muito.

Ao meu orientador Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura, por sua orientação durante o período de graduação, bem como pela confiança e paciência.

Ao Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas pela oportunidade concedida de poder estagiar no Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR), bem como por todos os ensinamentos repassados durante o estágio.

A todos os professores do Departamento de Zootecnia, pela confiança, paciência, ensinamentos e conselhos durante a graduação.

A todos os meus amigos e colegas de graduação que foram essenciais durante essa jornada, pela confiança, pela camaradagem, pelos momentos felizes e tristes compartilhados. Vocês fazem parte do alicerce da minha caminhada.

Aos meus companheiros do Laboratório de Fisiologia Animal que durante todos esses anos me acolheram com muito amor, carinho e compreensão.

Aos mais recentes companheiros do LFCR, por toda a atenção, carinho, companheirismo e compreensão durante o período do estágio.

As instituições de fomento CAPES e CNPq, pela concessão das bolsas, em especial o do programa Ciências Sem Fronteiras cuja experiência não pode ser expressa em palavras.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
2	OBJETIVO.....	7
3	DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO	8
4	BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO	9
5	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS E ACOMPANHADAS.....	10
5.1	Manejo dos animais experimentais	10
5.2	Produção de embriões bovinos por fecundação <i>in vitro</i> (PIV)	11
5.2.1	Soluções, suas finalidades e composições.....	12
5.2.1.1	Solução de transporte.....	12
5.2.1.2	TCM-HEPES	12
5.2.1.3	Meio de Manipulação	13
5.2.1.4	Meio de MIV	13
5.2.1.5	Gradiente de Percoll	14
5.2.1.6	Meio Brackett-Oliphant (BO)	16
5.2.1.7	Synthetic oviductal fluid (SOF).....	17
5.2.2	Protocolo de produção <i>in vitro</i> de embriões (PIV)	19
5.2.2.1	Protocolo de maturação <i>in vitro</i> (MIV)	19
5.2.2.2	Protocolo de fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	20
5.2.2.3	Protocolo de Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	21
5.2.3	Produção de embriões bovinos por fecundação <i>in vitro</i> em três diferentes sistemas de incubação.....	22
5.2.3.1	Protocolo experimental	22
5.2.3.2	Coloração com Hoechst.....	22
5.2.3.3	Contagem do número total de células/blastocistos	23
5.3	Cultivo de fibroblastos	24
5.3.1	Soluções, suas finalidades e composições.....	25
5.3.1.1	Meio de cultivo	25
5.3.1.2	Phosphate Buffered Saline (PBS).....	26
5.3.1.3	Trypsina + EDTA.....	26
5.3.2	Protocolo de isolamento de células adultas proveniente de biópsia auricular	26
5.3.3	Protocolo de passagem de células.....	28
5.3.4	Protocolo de avaliação da viabilidade celular pela integridade da membrana	

celular por coloração com azul de tripan.	30
5.1.5 Protocolo de Funcionalidade celular (PDT e Taxa de Crescimento).....	31
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
REFERENCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

A atividade agropecuária atua diretamente no desenvolvimento econômico de um país através dos processos de fornecimento de alimentos à população, geração de emprego e renda, incrementando o mercado consumidor para bens industrializados bem como formação de divisas para o mercado de insumos e bens de capitais necessários (BRASIL, 2014). No Brasil as condições naturais, tais como variações climáticas e território, favorecem o mercado agropecuário, o qual apresenta grande importância econômica, sendo essa observada através de sua alta participação no PIB nacional. Em 2015, o PIB do agronegócio foi de R\$ 1,26 trilhão, equivalente a 21% do PIB brasileiro, sendo 30% (R\$ 400,7 bilhões) referentes à pecuária (ABIEC, 2016).

A aplicação de tecnologias a pecuária tornou-se imprescindível para o desenvolvimento dos rebanhos brasileiros. Além disso, estudos nas áreas de nutrição animal, melhoramento genético, bem-estar animal, dentre outras, tem colaborado para a otimização acarretando em aumento na produtividade dos sistemas produtivos no Brasil.

Devido à crescente demanda por alimentos, a produção animal deixou de ser uma atividade de subsistência e extrativista para ser uma atividade comercial. Portanto, surgiu a necessidade de animais que expressassem melhores desempenhos e que fossem mais adaptados a diversas condições ambientais. Com esta finalidade, desenvolveram-se os diversos programas de melhoramento genético animal, tais como o Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore – PMGRN, o de Caprinos e Ovinos de Corte – GENECOC e o de Aves e Suínos da EMBRAPA (COUTINHO *et al.* 2010). Atrelado a esta área do conhecimento, estudos e técnicas relacionadas à reprodução foram desenvolvidos, visando à perpetuação de características genéticas superiores nos rebanhos comerciais. Dentre estas técnicas, encontram-se a produção *in vitro* de embriões e o cultivo de fibroblastos.

2 OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo descrever as atividades acompanhadas e realizadas no Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR-UECE), referente a duas biotécnicas reprodutivas, o cultivo de fibroblastos e a produção *in vitro* de embriões.

3 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O estágio supervisionado de conclusão do curso de graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC) foi realizado durante o período de 15 de agosto a 15 de novembro de 2016 no Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR) da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

O LFCR foi fundado em 1998 e faz parte da Faculdade de Veterinária (FAVET) da UECE. Sob coordenação do Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas, o laboratório desenvolve projetos de pesquisas relacionadas à biotecnologia da reprodução de caprinos e ovinos, nas seguintes linhas: ultrassonografia na reprodução, produção de embriões (*in vivo* e *in vitro*), transgênese e transferência nuclear de células somáticas (clonagem).

O LFCR possui uma área construída de aproximadamente 200 m², cujas instalações são constituídas de salas para reuniões, preparo dos animais, colheita de oócitos/embriões, preparo de meios, micromanipulação de embriões, biologia molecular, copa e banheiros. Além destes, o LFCR possui instalações para a manutenção de animais experimentais composto por caprinos da raça Canindé e mestiços. As estruturas são compostas por três apriscos suspensos, sendo dois destinados às fêmeas e um aos machos, baias de quarentena, sala para armazenamento de materiais e solário.

4 BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO

A contaminação em cultivo de células é um problema comumente enfrentado pelos laboratórios, podendo ser de origem química ou biológica.

Os contaminantes químicos são descritos pela presença de impurezas nas soluções, meios e reagentes utilizados. A presença de substâncias nocivas pode alterar o comportamento das células, afetando, desta maneira o resultado dos experimentos. Enquanto os contaminantes microbiológicos caracterizam-se pela presença de bactérias, vírus, micoplasmas, bolores, leveduras, bem como contaminação cruzada por outras linhas de células (THERMOFISHER SCIENTIFIC, 2015).

Devido à impossibilidade de eliminação completa dos contaminantes, boas práticas laboratoriais são adotadas visando a redução e o controle, tais como:

- Não comer, beber, fumar ou aplicar cosméticos dentro do laboratório;
- Usar vestimenta adequada;
- Descartar vidros e objetos pontiagudos em invólucros adequados;
- Lavar as mãos antes dos procedimentos;
- Limpar todos os equipamentos e suprimentos a serem utilizados com álcool 70% antes dos procedimentos;
- Descontaminar antes e depois, com álcool 70%, todas as superfícies de trabalho sempre que ocorrer manipulação de material;
- Abrir todos os materiais estéreis somente sob fluxo laminar;
- Limpar todos os materiais a serem utilizados dentro do fluxo laminar com álcool 70% e submetê-los a exposição em luz UV por 15 minutos antes do início dos procedimentos, exceto os líquidos;
- Descontaminar todos os materiais ditos não estéreis por autoclavação;
- Destinar o lixo não contaminado ao descarte comum. Contudo, o lixo contaminado deve ser acondicionado em recipiente coletor para material perfuro-cortante (Descarpack®) e enviado para contêineres específicos.

5 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS E ACOMPANHADAS

5.1 Manejo dos animais experimentais

Manejo pode ser definido pelo conjunto de atividades desenvolvidas com os animais visando o aumento da produtividade, estando relacionados com a nutrição, sanidade, reprodução, dentre outros.

A adoção de um adequado manejo nutricional é imprescindível para o desenvolvimento do rebanho. As exigências nutricionais dos animais estão relacionadas a diversas características, tais como: raça, aptidão produtiva, idade do animal, tamanho corporal, estágio fisiológico e fatores ambientais (ALBUQUERQUE *et al.*, 2005 *apud* PEREIRA *et al.*, 2007). Dentre os diversos bancos de dados de exigência nutricional existentes, destaca-se o *Nutrient Requirements of Small Ruminates* publicado pelo *National Research Council-NRC* em 2007 (PEREIRA *et al.*, 2007).

O fornecimento de nutrientes na sequência, proporção e frequência apropriadas visa a manutenção adequada do balanço de nutrientes, maximização do consumo de matéria seca (CMS), otimização da fermentação ruminal bem como minimização dos problemas de saúde (RODRIGUES, 2004). Portanto, a adoção de boas práticas relacionadas ao fornecimento da dieta objetiva o melhor consumo e, conseqüentemente, o alcance do desempenho esperado (PEREIRA *et al.*, 2007).

O manejo nutricional do rebanho é constituído da seguinte forma:

- Fêmeas: 1 kg de feno Tifton 85 fornecido em duas refeições diárias por animal com suplementação de 100 g de ração concentrada (Caprino Top® – Integral Mix). O fornecimento de água ocorre *ad libitum*;
- Machos: 1 kg de feno Tifton 85 fornecido em duas refeições diárias por animal com suplementação de 200 g de ração concentrada (Caprino Top® – Integral Mix). O fornecimento de água ocorre *ad libitum*.

As quantidades de volumoso ofertadas foram baseadas no consumo diário dos animais com manutenção de 10% de sobra. Com relação as quantidades de concentrado, foram formuladas de acordo com as tabelas para pequenos ruminantes do NRC (2007).

As instalações e os equipamentos visam proporcionar condições de manejo apropriadas para o sistema de produção. Características como facilidade de limpeza e desinfecção, funcionalidade e segurança, proporcionam aos animais melhores condições

sanitárias e ambientais e, aos trabalhadores, otimização da mão de obra (SANDOVAL *et. al*, 2011).

As fêmeas são mantidas confinadas, em duplas, em apriscos suspensos de piso ripado, construídos no sentido leste oeste, com altura de 3 m de pé direito. As baias possuem 9,18 m², com acesso a comedouros de ração, de sal mineral e bebedouros. Já os machos são mantidos em apriscos suspensos de piso ripado, em baias individuais. A instalação encontra-se construída no sentido leste oeste, com altura de 2 m de pé direito. As baias possuem 4,18 m², com acesso a comedouros de ração, sal mineral e bebedouros.

Visando o bem-estar dos animais, diariamente, as fêmeas têm acesso ao solário das 8:00 as 11:00 horas da manhã, enquanto os machos, sob revezamento, soltos individualmente nos períodos da manhã e da tarde.

Objetivando a manutenção da atividade reprodutiva dos machos, semanalmente, são realizadas coletas de sêmen através de vagina artificial. Além disso, nos períodos do ano de temperaturas mais elevadas, os animais são tosados e banhados.

As baias de quarentena são utilizadas para o isolamento de animais enfermos, em tratamento ou que serão introduzidos no rebanho, sendo mantidos em observação e acompanhados por um médico veterinário.

5.2 Produção de embriões bovinos por fecundação *in vitro* (PIV)

A produção de embriões *in vitro* (PIV) engloba os processos de colheita, maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo (CIV). Esta biotécnica tem sido utilizada para acelerar a produção de animais geneticamente superiores, reduzir o descarte precoce de fêmeas de genética superior impedidas de reproduzir, aprofundar os conhecimentos fisiológicos, bioquímicos e biotecnológicos das espécies utilizadas e preservar raças ou linhagens importantes (GONÇALVES *et. al*, 2008).

Contudo, existem limitações associadas ao emprego da PIV, tais como: o custo inicial para implementação do método, o tempo consumido para execução das rotinas e a ineficiência de protocolos de criopreservação para oócitos. Embora apresente limitações, a PIV tem sido amplamente utilizada no desenvolvimento de outras biotécnicas, tais como: clonagem por transferência nuclear, transgenia, dentre outras (GONÇALVES *et al.*, 2008).

5.2.1 Soluções, suas finalidades e composições

5.2.1.1 Solução de transporte

A solução de transporte (Tabela 4) objetiva a manutenção de condições mínimas fisiológicas no transporte dos ovários do abatedouro ao laboratório.

A solução fisiológica de 0,9% de NaCl visa a conservação dos ovários durante o transporte através da manutenção da pressão osmótica das células. A adição de pentabiótico veterinário objetiva a diminuição da proliferação de contaminantes.

Tabela 4 - Reagentes e quantidades utilizados para preparação de meio de transporte.

Reagente	Empresa (código)	Conc. Final	Quantidade
Água destilada	---	---	qsp
NaCl	Sigma (S5886)	0,9%	6,3 g
Pentabiótico veterinário	Fort Dodge	0,05 g/L	0,035 g
Volume final			700 mL

5.2.1.2 TCM-HEPES

O complexo meio de cultivo, TCM-199, cuja composição apresenta sais inorgânicos, amino ácidos, vitaminas e outros compostos, tem sido um dos meios de cultivo mais utilizados em estudos de maturação oocitária em bovinos (GORDON, 2003). Diferentemente do meio descrito por Morgan (1950), o TCM-199 (M2154) não apresenta o amino ácido L-glutamina, sendo posteriormente adicionada para o meio de MIV.

A utilização do HEPES em meios tem por objetivo a manutenção do pH, cuja oscilação está correlacionada a progressão meiótica e a atividade do fator promotor da maturação (MPF) no processo de maturação oocitária (EDWARDS *et al.*, 1999 *apud* GORDON, 2003). Meios contendo HEPES submetidos a atmosfera rica em CO₂ acidificam-se, sendo assim, equilibrados somente a temperatura de 37 °C (GORDON, 2003).

A tabela 5 apresenta a composição do TCM-HEPES.

Tabela 5 - Reagentes e quantidades utilizados para preparação de meio TCM-HEPES

Reagente	Empresa (código)	Conc. Final	Quantidade
TCM-199	Sigma (M2154)	---	500 mL
HEPES	Sigma (H6147)	25 mM	2,9766 g
Volume final			500 mL

Filtrar e ajustar o pH da solução para 7,4.

5.2.1.3 Meio de Manipulação

O meio de manipulação é o meio TCM-HEPES suplementado com alguns reagentes cujo objetivo é a utilização nos processos de manipulação dos oócitos durante classificação, mudança de meios, desnudação, dentre outros.

O piruvato de sódio é utilizado pelas células como fonte de energia, também está relacionado com o metabolismo de amino ácidos e os processos do ciclo de Krebs (SIGMA-ALDRICH, 2015).

Os reagentes, e suas respectivas quantidades, utilizados para a preparação de meio de manipulação são descritos a seguir:

Tabela 6 - Reagentes e quantidades utilizados para preparação de meio de manipulação.

Reagente	Empresa (código)	Conc. Final	Quantidade
TCM-HEPES	---	---	Qsp
ATB/ATM	Sigma (A5955)	1x	500 µL
Piruvato de sódio	Sigma (P4562)	0,2 mM	500 µL
SFB	Gibco (12657-029)	10%	5 mL
Volume final			50 mL

Validade: 1 mês (2-8°C).

5.2.1.4 Meio de MIV

Estudos relacionados ao desenvolvimento de meios de cultura objetivam a reprodução das condições fisiológicas e bioquímicas presentes *in vivo* em sistemas *in vitro*. Dentre os componentes do meio de MIV, encontram-se o hormônio folículo estimulante (FSH), o hormônio luteinizante (LH) e o estradiol (E₂), cujas funções, *in vivo*, estão relacionadas a alguns processos, tais como: estimulação da proliferação e diferenciação das células da granulosa, indução da secreção de andrógenos pelas células da teca e modificações celulares envolvidas na capacidade de fertilização do oócito, respectivamente (HUNZICKER-DUNN & MAYO, 2006; SILVA *et al.*, 2006 ; LIMA-VERDE *et al.*, 2011).

Inerentes aos processos *in vitro*, estudos relataram crescimento significativo nas taxas de mórula e blastocisto após adição do fator de crescimento epidérmico (EGF) e da inclusão de FSH, quando na presença de estradiol, ao meio de maturação. Contudo, a adição de diferentes concentrações de LH não apresentaram diferenças para as respectivas taxas (ALI AND SIRARD, 2002 *apud* GORDON, 2003).

A cisteamina é um tiol de baixo peso molecular que em processos de maturação e cultivo *in vitro* de embriões, melhoram o desenvolvimento de blastocistos *in vitro* em bovinos e elevam as taxas de concentração da glutatona intracitoplasmática oocitária (GSH; DE MATOS *et al.*, 1995 *apud* URDANETA *et al.*, 2003), que por sua vez, está relacionada a vários mecanismos, tais como, síntese proteica e proteção contra estresse oxidativo (URDANETA *et al.*, 2003)

A L-Glutamina é um amino ácido essencial que serve como fonte de energia pelas células em cultivo. Contudo, quando presente em solução, degrada-se rapidamente, por esse motivo, visando maior período de prateleira do meio de cultivo, recomenda-se a aquisição de meios sem L-Glutamina.

A tabela 7 apresenta a composição do meio de MIV.

Tabela 7 - Reagentes e quantidades utilizados para preparação de meio de MIV.

Reagente	Empresa (código)	Conc. Final	Quantidade
TCM-199	Sigma (M2154)	---	qsp
ATB/ATM	Sigma (A5955)	1x	50 µL
Piruvato de sódio	Sigma (P4562)	0,2 mM	50 µL
SFB	Gibco (12657-029)	10%	500 µL
Cisteamina	Sigma (M9768)	0,1 mM	25 µL
EGF	Sigma (E4127)	10 ng/mL	50 µL
FSH/LH (Pluset)	Hertape-Calier	20 µg/mL	50 µL
E ₂	Sigma (E8875)	1 µg/mL	20 µL
L-Glutamina	Sigma (G8540)	1 mM	25 µL
Volume final			5 mL

EGF: Fator de crescimento epidérmico; FSH: Hormônio folículo estimulante; LH: Hormônio luteinizante; E₂: Estradiol.

5.2.1.5 Gradiente de Percoll

A preparação dos espermatozoides para o processo de fecundação *in vitro* (FIV), objetiva a retirada do plasma seminal bem como de células somáticas e espermatozoides morfológicamente anormais ou mortos. Portanto, resultando no aumento da percentagem de espermatozoides móveis e morfológicamente normais a serem utilizados na FIV (PARRISH *et al.*, 1995). Para preparação, foram desenvolvidos diversos métodos, dentre os quais, incluem-se o Gradiente de Percoll e o *swim-up*.

O Percoll caracteriza-se por uma suspensão coloidal de partículas de sílica revestidas por polivinilpirrolidona utilizada para separação de células, partículas subcelulares

e vírus de maior tamanho, não apresentando característica tóxica as células e não aderência às membranas (GORDON, 2003; GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES).

O método de separação dos espermatozoides utilizando Percoll apresenta duas principais vantagens: a separação rápida e eficiente das células espermáticas do plasma seminal e de espermatozoides não viáveis daqueles de maiores motilidades (GORDON, 2003). O *swim-up*, por sua vez, caracteriza-se pela migração de espermatozoides viáveis provenientes de *pellet* previamente lavado para um meio sobreposto (JAMEEL, 2008).

Em estudos conduzidos por Parrish *et al.* (1995) foi avaliada a eficiência de dois métodos de separação de espermatozoides bovino após descongelamento: Percoll e *swim-up*. Os autores concluíram que devido à alta percentagem de espermatozoides moveis bem como a equivalente capacidade de desenvolvimento dos embriões obtido por ambos os métodos, a separação por Percoll seria recomendada para utilização em rotinas de FIV bovina. Além disso, o método mostrou-se simples e mais rápido comparado ao *swim-up*.

A tabela 8 e 9 apresentam as composições das soluções para o gradiente de Percoll.

Tabela 8 - Reagentes e quantidades utilizados para preparação de solução de PBS 10x com bicarbonato de sódio

Reagente	Empresa (código)	Conc. Final	Quantidade
Água	Sigma (W3500)	---	Qsp
NaCl	Sigma (S5886)		0,8 g
KCl	Sigma (P5405)		0,02 g
NaH ₂ PO ₄	Sigma (S5011)		0,052 g
KH ₂ PO ₄	Sigma (P5655)		0,02 g
NaHCO ₃	Sigma (S5761)		0,21 g
Volume final			10 mL

Filtrar a solução.

Tabela 9 - Reagentes e quantidades utilizados para preparação de isopercoll

Reagente	Empresa (código)	Conc. Final	Quantidade
PBS 10x + bicarbonato	---	---	667 µL
Percoll			8,224 mL
HCl 1 N*	---	---	70 µL
Volume final			8,961 mL

*Adicionar gota a gota. Homogeneizar entre cada gota. Validade 15 dias (2-8°C). Ajustar pH para 7,4 e osmolaridade para 300 mOsm.

5.2.1.6 Meio Brackett-Oliphant (BO)

A capacitação espermática constitui-se de uma associação de mudanças na fisiologia celular e bioquímica dos espermatozoides acarretando na capacidade de fecundação (FLORMAN E DUCIBELLA, 2006).

Visando mimetizar os eventos ocorridos no trato reprodutor feminino, diferentes tratamentos são empregados na capacitação espermática *in vitro*. Brackett e Oliphant (1975) desenvolveram uma técnica objetivando a fecundação *in vitro* por espermatozoides ejaculados de coelho. Os resultados obtidos relataram a remoção ou alteração dos componentes do plasma seminal da superfície dos espermatozoides estimulando os processos de capacitação espermática.

Em 1988, Niwa e Ohgoda descreveram a adição de cafeína e heparina ao meio desenvolvido por Brackett e Oliphant (1975), sendo observadas maiores taxas de penetração nos oócitos em meios suplementados por ambas substâncias.

A tabela 10, 11, 12, 13 e 14 apresentam as composições das soluções para o meio *Brackett-Oliphant*.

Tabela 10 - Reagentes e quantidades utilizados para preparação de solução A do meio BO

Reagente	Empresa (código)	Conc. Final	Quantidade
Água	Sigma (W3500)	---	Qsp
NaCl	Sigma (S5886)		0,4309 g
KCl	Sigma (P5405)		0,0197 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	Sigma (C7902)		0,0217 g
NaH ₂ PO ₄	Sigma (S5011)		0,0084 g
MgCl ₂	Sigma (M8266)		0,0032 g
Vermelho de fenol	Sigma (P0290)		10 µL
Volume final			50 mL

Tabela 11 - Reagentes e quantidades utilizados para preparação de solução B do meio BO

Reagente	Empresa (código)	Conc. Final	Quantidade
Água	Sigma (W3500)	---	Qsp
NaHCO ₃	Sigma (S5761)		0,3234 g
Vermelho de fenol	Sigma (P0290)		5 µL
Volume final			25 mL

Tabela 12 - Reagentes e quantidades utilizados para preparação de meio BO

Reagente	Empresa (código)	Conc. Final	Quantidade
Solução A	---	---	38 mL
Solução B	---	---	12 mL
Piruvato de sódio	Sigma (P4562)		0,0069 g
ATB/ATM	Sigma (A5955)		1 mL
Volume final			50 mL

Filtrar. Validade 15-20 dias (2-8°C).

Tabela 13 - Reagentes e quantidades utilizados para preparação de *Semen Diluent Solution* (SDS)

Reagente	Empresa (código)	Conc. Final	Quantidade
BO	---	---	5 mL
BSA	Sigma (A9647)		0,100 g
Volume final			5 mL

Tabela 14 - Reagentes e quantidades utilizados para preparação de *Semen Washing Solution* (SWS)

Reagente	Empresa (código)	Conc. Final	Quantidade
BO	---	---	45 mL
Cafeína	Sigma (C0750)		0,090 g
Heparina	Calbiochem (375095)		45 µL
Volume final			45 mL

Adicionar 100 µL de HCl 1 N (Sigma 320331; 836 µL para 10 mL de água).

5.2.1.7 Synthetic oviductal fluid (SOF)

Objetivando a manutenção de um ambiente favorável para a ocorrência dos eventos que ocorrem durante o período de pré-implantação embrionária, diferentes métodos têm sido utilizados, tais como: o desenvolvimento em ovidutos (*in vivo*) de embriões produzidos *in vitro* até o estágio de blastocistos, o co-cultivo de embriões com células somáticas e o cultivo de embriões em meios quimicamente definidos (GONÇALVES *et al.*, 2008). Devido à baixa praticidade, alto custo e risco de infecção dos embriões, a atual tendência é a utilização de meios quimicamente definidos (GONÇALVES *et al.*, 2008; HOLM *et al.*, 1999).

A constituição do meio mimetiza as condições proporcionadas pelos fluidos uterinos e do oviduto durante o início da gestação. Para o protocolo acompanhado, foi utilizado o SOF como meio para cultivo de embriões, sendo descrita a função de seus componentes a seguir.

A presença de íons inorgânicos, como potássio, cloro, cálcio, sódio e magnésio, reproduz a constituição dos fluidos do trato reprodutor feminino, que possuem concentrações

mais elevadas de potássio e cloro e mais baixas de cálcio no fluido do oviduto em comparação ao plasma. Porém, os níveis de sódio e magnésio são similares ao do soro (GONÇALVES *et al.*, 2008).

Devido ao fato da utilização de glicose por embriões ser realizada somente a partir do estágio de mórula, em bovinos, utiliza-se o piruvato de sódio como fonte de energia para os embriões em cultivo nesses estágios iniciais de desenvolvimento (GONÇALVES *et al.*, 2008).

O citrato estimula a produção de ácidos graxos e atua como quelante de íons metálicos, podendo estar associado com a compactação e a formação da blastocle (GOODRIDGE, 1973 e GRAY *et al.*, 1992 *apud* HOLM *et al.*, 1999). O mio-inositol e seus metabolitos, por sua vez, estão relacionados com processos de sinalização celular bem como efeitos mitogênicos (DOWNES & MACPHEE, 1990 *apud* HOLM *et al.*, 1999).

Os aminoácidos (essenciais e não-essenciais) atuam como substrato energético, reguladores de pH e agem na síntese proteica (GOLÇALVES *et al.*, 2008). Por sua vez, a albumina sérica bovina (BSA) liga-se a moléculas de lipídios que atuam na estabilização dos fatores de crescimento (ELDER & DALE, 2011).

A tabela 15 apresenta as composições das soluções para o meio SOF.

Tabela 15 - Reagentes e quantidades utilizados para preparação de SOF

Reagente	Empresa (código)	Conc. Final	Quantidade
Água	Sigma (W1503)	---	40 mL
NaCl	Sigma (S5886)		0,3146 g
KCl	Sigma (P5405)		0,0267 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	Sigma (C7902)		0,0124 g
KH ₂ PO ₄	Sigma (P5655)		0,0081 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	Sigma (63138)		0,0091 g
NaHCO ₃	Sigma (S5761)		0,1055 g
Piruvato de sódio	Sigma (P4562)		0,0181 g
Vermelho de fenol	Sigma (P0290)		50 µL
Lactato de sódio	Sigma (L7900)		72 µL
BME	Sigma (B6766)		100 µL
MEM	Sigma (M7145)		50 µL
Sódio tri citrato	Sigma (S1804)		0,0050 g
Mio inositol	Sigma (I7508)		0,0250 g
ATB/ATM	Sigma (A5955)		500 µL
BSA-FAF	Sigma (A6003)	0,8%	0,4 g
Água	Sigma (W1503)	---	15 mL
Retirar até 50 mL (separar para SOF sem SFB).			
SFB	Gibco (12657-029)	2,5%	1,25 mL
Volume final			50 mL

BME – basal médium Eagle's (aminoácidos não essenciais); MEM – minimum essential médium (aminoácidos essenciais) ; BSA – Albumina sérica bovina. Filtrar. Aliquotar (tubos de 15 mL). Validade: 1 mês (2-8°C).

5.2.2 Protocolo de produção *in vitro* de embriões (PIV)

5.2.2.1 Protocolo de maturação *in vitro* (MIV)

Para cada rotina de MIV, foram preparadas as soluções descritas na tabela 16.

Tabela 16 - Soluções utilizadas, por rotina, para protocolo de MIV

Solução	Quantidade	Armazenamento
Solução de transporte	700 mL	Banho-maria
Meio de manipulação	25 mL	Aquecedor de tubos
Meio de MIV	5 mL	Incubadora

Observações:

Utilizar 20 mL do meio de manipulação para o processo de seleção oocitária e 5 mL para a punção folicular.

Preparar placas de quatro poços contendo 500 µL de meio de MIV e estabilizar previamente por, no mínimo, 2 horas em incubadora com 5% CO₂.

Coleta de Ovários:

01. Coletar ovários, provenientes de abatedouro comercial, e acondicionar em vasilha térmica contendo meio de transporte aquecido a 34 °C.

Punção Folicular:

02. Lavar os ovários com meio de transporte aquecido a 34 °C;

03. Puncionar folículos ovarianos de 2 a 8 mm com agulha 18G acoplada à seringa de 10 mL contendo 1 mL de meio de manipulação;

04. Transferir o conteúdo aspirado para tubos de 50 mL.

Seleção Oocitária:

05. Após decantação dos oócitos, aspirar o *pellet* contendo os complexos *cumulus*-oócito (CCOs) e transferir para placas de 100 mm contendo meio de manipulação;

06. Coletar CCOs com o auxílio de estereomicroscópio;

07. Transferir as estruturas para placas de 35 mm contendo 2-3 mL de meio de manipulação;

08. Selecionar estruturas viáveis à MIV (CCOs que apresentem citoplasma homogêneo e, no mínimo, 3 camadas de células do *cumulus*);

09. Submeter as estruturas selecionadas à MIV sob as seguintes condições: 50-60 CCOs/poço; 38,5 °C; 5% CO₂; por 22-24 h).

5.2.2.2 Protocolo de fecundação *in vitro* (FIV)

Para cada rotina de FIV, foram preparadas as soluções descritas na tabela 17.

Tabela 17 - Soluções utilizadas, por rotina, para protocolo de FIV

Solução	Quantidade	Armazenamento
Gradiente de Percoll	4 mL	Incubadora
SDS	1 mL	Incubadora
SWS	10 mL	Aquecedor de tubos
Meio de manipulação	10 mL	Aquecedor de tubos

Observações:

Preparar as soluções de gradiente de Percoll e SDS, em seguida, estabilizar as soluções previamente por, no mínimo, 6 horas em incubadora com 5% CO₂.

Preparo do Sêmen:

01. Preparar o gradiente de Percoll de acordo com o descrito anteriormente;
02. Descongelar a palheta de sêmen por 5 s em temperatura ambiente e 25 s em banho-maria a 37 °C;
03. Retirar a palheta do banho-maria e secar com papel toalha;
04. Cortar ambas extremidades da palheta, dispensando o conteúdo sobre o gradiente de Percoll;
05. Centrifugar o sêmen (700g; 25 min) e retirar o sobrenadante, sem afetar o *pellet*, e adicionar 2 mL de SWS;
06. Centrifugar o sêmen (500g; 10 min) e retirar o sobrenadante, sem afetar o *pellet*, e adicionar 2 mL de SWS;
07. Centrifugar o sêmen (400g; 10 min); Retirar o sobrenadante, sem afetar o *pellet*, e adicionar 50 µL/palheta de SWS e, o mesmo volume, de SDS;
08. Homogeneizar a amostra na solução e retirar 10 µL da suspensão e dispensar em 990 µL de água destilada para contagem em câmara de Neubauer; armazenar a suspensão de espermatozoides (sptz) em incubadora com 5% CO₂;
09. Ajustar a concentração espermática para 20x10⁶ sptz/mL, sendo metade do volume com SWS e metade com SDS; realizar o cálculo do ajuste como exemplificado a seguir:

$$\begin{aligned}
 C1 \times V1 &= C2 \times V2 \\
 40 \times 10^6 \times 1 &= 20 \times 10^6 \times V2 \\
 V2 &= 2 \text{ mL}
 \end{aligned}$$



0,5 mL de SWS
+
0,5 mL de SDS

10. Preparar gotas de 100 µL em placas de 35 mm e cobrir com óleo mineral;
11. Lavar os CCOs submetidos à MIV em meio de manipulação;
12. Coincubar CCOs e sptz por 6 h nas seguintes condições: 30-40 CCOs/gota; 38,5 °C; 5% de CO₂.

5.2.2.3 Protocolo de Cultivo *in vitro* (CIV)

Para cada rotina de CIV, foram utilizadas as soluções descritas na tabela 18.

Tabela 18 - Soluções utilizadas, por rotina, para protocolo de CIV.

Solução	Quantidade	Armazenamento
Meio de manipulação	10 mL	Aquecedor de tubos
SOF	1 mL	Incubadora

Observações:

Preparar a solução de SOF, distribuir em placas de 35 mm e estabilizar previamente por, no mínimo, 2 horas em incubadora com 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂.

01. Retirar os zigotos da gota de FIV;
02. Transferir os zigotos para tubos de 15 mL contendo 1-2 mL de meio de manipulação;
03. Vortexizar por 2 min, a velocidade 5, para remoção das células do *cumulus*;
04. Lavar os zigotos em meio de manipulação;
05. Cultivar os zigotos em gotas de 50 µL de SOF por 7 dias nas seguintes condições: 25-30 zigotos/gota; 38,5 °C; 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂.
06. No dia 2, avaliar o número de zigotos que sofreram clivagem e separar em dois grupos: não clivados e clivados;
07. Calcular a taxa de clivagem da seguinte maneira:

$$\frac{\text{Número de zigotos clivados}}{\text{Total de zigotos}} \times 100$$

08. No dia 7 e 8, avaliar o número de blastocistos presente de ambos os grupos;
09. Calcular a taxa de blastocisto da seguinte maneira:

$$\frac{\text{Número de blastocistos}}{\text{Total de zigotos submetidos a FIV}} \times 100$$

5.2.3 Produção de embriões bovinos por fecundação *in vitro* em três diferentes sistemas de incubação

A biotecnologia atrelada à reprodução, em bovinos, através da utilização de métodos como a inseminação artificial, transferência e produção *in vitro* de embriões (PIVE) contribuíram para o desenvolvimento da bovinocultura nacional (Cavalieri *et al.*, 2015). O emprego da PIVE na pecuária proporciona um grande ganho genético aos rebanhos, devido a maior produção de descendentes provenientes de um animal geneticamente superior. Além disso, a praticidade e portabilidade desta biotécnica tornam-se importante em nível de campo tendo em vista as grandes distâncias existentes entre os laboratórios e as fazendas. Portanto, o presente tópico tem por objetivo descrever os protocolos associados à PIVE em três diferentes sistemas de incubação e a avaliação da maturação nuclear de oócitos e desenvolvimento embrionário em bovinos.

5.2.3.1 Protocolo experimental

Os protocolos utilizados foram descritos anteriormente no tópico 5.2.2 – Protocolo de produção *in vitro* de embriões. O atual tópico visa descrever os sistemas de incubação utilizados. Para os processos de MIV, FIV e CIV, os oócitos ou embriões foram mantidos a 38,5 °C em três diferentes sistemas de incubação: incubadora de bancada (Thermo Fischer, Waltham, EUA) com oxigênio elevado (5% CO₂ em ar), incubadora de bancada (Eve, WTA, Cravinhos, Brasil) com oxigênio reduzido (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂) e incubadora portátil (LabMix, WTA) com oxigênio reduzido.

Para verificação de maturação nuclear, oócitos foram submetidos à coloração com Hoechst e referentes ao desenvolvimento embrionário, os embriões foram submetidos ao protocolo de contagem de número total de células/blastocistos após o dia 8 de desenvolvimento.

5.2.3.2 Coloração com Hoechst

01. Transferir os oócitos para placas de quatro poços contendo 500 µL de PBS com BSA na concentração de 3 mg/mL (PBS_{BSA});
02. Após transferidos, observar os oócitos com o auxílio de estereomicroscópio e, caso necessário, pipetar repetidas vezes para retiradas de células do *cumulus* remanescentes;

03. Transferir os oócitos para poços contendo solução de glutaraldeído 0,5% (495 μL PBS_{BSA} e 5 μL de solução de 50% de glutaraldeído);
04. Deixar em solução com glutaraldeído por 30 min;
05. Transferir os oócitos para tubos de 1,5 – 2,0 mL contendo 500 μL de PBS_{BSA} ;
06. Armazenar a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até processo de preparação de lâminas;
07. Retirar os oócitos dos tubos e depositar em poços contendo 500 μL de PBS_{BSA} ;
08. Realizar sucessivas pipetagens para retirada de impurezas;
09. Transferir para poço contendo solução de Hoechst 10 μM (5,5 μL de solução estoque 200 μM e 94,5 μL de PBS_{BSA});
10. Incubar protegidas da luz por 15 min;
11. Transferir novamente para solução de PBS_{BSA} ;
12. Em lâminas, colocar duas gotas de *mountain médium* (4 μL) e 4 μL de meio com oócitos (5 a 10 oócitos por gota);
13. Posicionar lamínulas sobre as gotas e fixar com esmalte;
14. Esperar secar e analisar em microscópio com fluorescência;
15. Armazenar as lâminas protegidas da luz a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.3.3 Contagem do número total de células/blastocistos

01. Lavar os blastocistos em poços contendo 500 μL de PBS_{BSA} ;
02. Transferir os blastocistos para poços de 500 μL contendo solução de paraformaldeído 4% em PBS;
04. Incubar em solução com paraformaldeído por 20-30 min;
05. Lavar os blastocistos (2x) em PBS_{BSA} por 5 min cada;
06. Transferir os oócitos para microtubos contendo 100 μL de PBS_{BSA} ;
06. Armazenar a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até processo de preparação de lâminas;
09. Transferir para poço contendo solução de Hoechst com concentração de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (15 μL de solução estoque 1 mg/mL e 985 μL de PBS_{BSA}); Permanecer em solução por 15 min;
11. Calibrar a ponteira para 5 μL , aspirar os embriões em menor volume possível e completar com glicerol;
12. Colocar os embriões na lâmina, posicionar lamínulas sobre as gotas e fixar com esmalte;
14. Analisar em microscópio óptico munido com fluorescência;
15. Armazenar as lâminas protegidas da luz a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3 Cultivo de fibroblastos

Clonagem pode ser definida como um processo de obtenção de cópias geneticamente idênticas, animal ou vegetal, através de reprodução assexuada, sendo utilizada com diversas finalidades, como a clonagem de espécies em vias de extinção, de animais transgênicos, de animais valiosos, bem como, a clonagem terapêutica (BENTO *et al.*, 2005; BORDIGNON, 2008). Apesar do contínuo aprimoramento da técnica, a clonagem ainda apresenta limitações, tais como, altas taxas de mortalidade embrionária e fetal, desenvolvimento de deficiências placentárias, anomalias cromossômicas, alto custo, questões éticas, dentre outros (BORDIGNON, 2008). Atualmente, a clonagem pode ocorrer de duas maneiras: por bipartição de embriões ou por transferência nuclear.

A clonagem por transferência nuclear baseia-se no princípio da substituição da cromatina de um oócito maturo por um núcleo de uma célula retirada do animal a ser clonado (BORDIGNON, 2008). Atualmente, são utilizados dois tipos de células doadoras de núcleo, as células embrionárias e as células somáticas.

A criopreservação de células somáticas tem sido utilizada com o objetivo da produção de bancos de células com maior representatividade genética das populações. Além disso, por meio da criopreservação é possível conservar amostras de ambos os sexos bem como evitar a perda de informações genéticas de indivíduos mortos antes do período de reprodução (LEÓN-QUINTO *et al.*, 2011).

Em estudo conduzido por Tian *et al.* (2003), foi avaliado a capacidade de reprogramação nuclear por clonagem de três tipos de células: células do *cumulus*, fibroblastos da pele e epitélio da glândula mamária. Os resultados demonstraram melhores taxas de blastocisto e nascidos vivos para embriões produzidos a partir de células do *cumulus*, seguido pelos fibroblastos da pele. Desta forma, fibroblastos da pele são considerados um dos tipos adequados de células doadoras de núcleo (CAMPBELL *et al.* 2007), tendo em vista sua fácil coleta e possibilidade de obtenção a partir de machos e fêmeas. Portanto, associado aos bancos de células, a utilização da transferência nuclear de células somáticas (TNCS), caracteriza uma possível estratégia preventiva na conservação de espécies (LEÓN-QUINTO *et al.*, 2014).

5.3.1 Soluções, suas finalidades e composições

5.3.1.1 Meio de cultivo

Os meios de cultivo são soluções quimicamente elaboradas objetivando a mimetização das condições *in vivo* em ambientes *in vitro*. Os meios de cultivo podem variar quanto à complexidade, desde os mais simples, como o Eagle's MEM até os mais complexos como o Dulbecco's modification of Eagle's MEM (DMEM) composto por amino ácidos, vitaminas, sais inorgânicos e outros componentes (FRESHNEY, 2000). Para a realização das atividades fora utilizado meio de cultivo DMEM (Tabela 1) suplementado com soro fetal bovino e antibiótico/antimicótico (Tabela 2). A utilização de antibiótico/antimicótico objetiva a redução de contaminações.

O soro constitui-se de fatores de crescimento, que estão associados à proliferação celular, fatores de adesão e de atividades antitripsina, que promovem a ligação das células ao substrato ou a outras células. Neste composto, também estão presentes proteínas, amino ácidos, lipídeos, carboidratos, hormônios, dentre outros. Os mais utilizados em protocolos de cultura de células são os soros de vitelo e fetal bovino, contudo, em alguns casos, também são utilizados os soros de cavalos adultos e de humanos (FRESHNEY, 2000).

Tabela 1 - Reagentes e quantidades utilizados para preparação de DMEM estoque (STK)

Reagente	Empresa (código)	Conc. final	Quantidade
DMEM	Gibco (12800-017)	13,5 g/L	1 pacote
NaHCO ₃	Sigma (S5761)	3,7 g/L	3,7 g
Água destilada	--	--	qsp
Volume final			1000 mL

Qsp – quantidade suficiente para. Ajustar o pH para 7,2 – 7,3. Filtrar e armazenar a 4°C.

Tabela 2 - Reagentes e quantidades utilizados para preparação de DMEM uso (DMEM+)

Reagente	Empresa (código)	Conc. final	Quantidade
DMEM STK	Gibco (11885)	13,5 g/L	88 mL
SFB	Gibco (12657029)	10%	10 mL
ATB/ATM	Gibco (15240)	2%	2 mL
Volume final			100 mL

Para uso, o meio DMEM⁺ deve ser pré-aquecido. SFB – Soro fetal bovino; ATB/ATM – Antibiótico/Antimicótico.

5.3.1.2 Phosphate Buffered Saline (PBS)

O Phosphate Buffered Saline (PBS) é uma solução salina balanceada utilizada em diversos protocolos laboratoriais, inclusive no cultivo de células, visando à manutenção da osmolaridade dos meios e, conseqüentemente, das trocas ocorridas entre o meio e as células. A composição da solução utilizada nos protocolos, encontra-se descrita na Tabela 3.

Tabela 3 - Reagentes e quantidades utilizados para preparação de PBS

Reagente	Empresa (código)	Conc. Final	100 mL
NaCl	Sigma (S5886)	136,9 mM	0,8 g
KCl	Sigma (P5405)	2,68 mM	0,02 g
NaH ₂ PO ₄	Sigma (S5011)	4,3 mM	0,154 g
KH ₂ PO ₄	Sigma (P5655)	1,2 mM	0,02 g
Água destilada	---	---	qsp
Volume final			100 mL

Ajustar pH para 7,4.

5.3.1.3 Tripsina + EDTA

Tripsina é uma enzima dissociadora comumente utilizada na digestão das proteínas ligadoras presentes na superfície das células, que atuam no processo de adesão às placas. Longos períodos de exposição são prejudiciais às células, sendo as mesmas removidas da tripsina por centrifugação (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016).

O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é um quelante utilizado na remoção de íons Ca²⁺, tendo em vista a dependência por íons Ca²⁺ pelas moléculas de adesão (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016). Os agentes quelantes são compostos químicos cuja estrutura química possibilita o “aprisionamento” de íons metálicos, tais agentes são utilizados em diversas áreas, tais como: na descontaminação de solos, em tratamento de doenças relacionadas a absorção de ferro, dentre outras (TAVARES, 2013; CANÇADO, 2007).

5.3.2 Protocolo de isolamento de células adultas proveniente de biópsia auricular

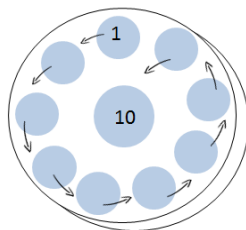
Com a utilização da TNCS como método de preservação da biodiversidade, estudos têm desenvolvido métodos que amplificaram as fontes de células somáticas a serem utilizadas, sendo descritos em diferentes espécies com diversos tipos de tecidos ou células (CAMPBELL *et al.* 2007). Dentre estes, encontra-se a utilização de fibroblastos da pele, cuja

obtenção pode ser inofensiva ao indivíduo, devido à coleta de pequenos fragmentos visando a não perturbação do bem-estar dos animais (LEÓN-QUINTO *et. al.* 2011).

A coleta de fragmentos de tecido foi realizada segundo o seguinte protocolo:

01. Realizar tricotomia no local que será realizada a biópsia e limpar com álcool 70%;
02. Utilizar pinça hemostática para delimitação do local e realizar o corte com auxílio de tesoura e pinça;
03. Depositar amostra em tubo de 50 mL contendo PBS acrescido de antibiótico a 2% e transportar até o laboratório a 4°C;
04. Sob fluxo laminar, preparar placas contendo DMEM⁺ com 10% ATB/ATM, DMEM⁺, álcool 70% e DMEM⁺;
05. Isolar as camadas da amostra com auxílio de lâmina de bisturi e pinça em placa petri de 100x20 mm contendo PBS com 2% ATB/ATM;
06. Separar a amostra em fragmentos de, aproximadamente, 2 mm² e realizar lavagens em PBS com 2% ATB/ATM:

- 6.1. Prepara uma placa de 100x20 mm com gotas (~ 10 gotas) de PBS com 2% ATB/ATM;



- 6.2. Em cada gota, “raspar” o fragmento com auxílio de agulha estéril para completa limpeza.
- 6.3. Ao trocar de gota, trocar as agulhas.
07. Lavar o fragmento em DMEM⁺ com 10% ATB/ATM e fixá-lo em placa de 35x15 mm, utilizar 4 explantes por placa;
08. Identificar placa com data, cultivo primário (A) e o tipo celular;
09. Incubar a 38,5°C, 5% de CO₂ a placa com os explantes fixados (sem meio) de 30 a 60 minutos;
10. Posteriormente, preencher a placa cuidadosamente com meio DMEM⁺;
11. Trocar o meio a cada 2 dias e observar diariamente até confluência $\geq 70\%$ das células em torno dos fragmentos;

12. Transferir os fragmentos para uma nova placa visando semeá-la. A placa possuindo apenas células deve ser cultivada em 2 mL de meio de cultivo com trocas de meio a cada dois dias até atingir confluência de 90-100%;
13. Após apresentarem alta confluência, as células devem ser lavadas com PBS e, posteriormente, submetidas ao protocolo de passagem de células.

5.3.3 Protocolo de passagem de células

O ambiente de cultivo influencia o processo através da natureza do substrato, do grau de contato das células, da constituição físico-química e fisiológica do meio, da constituição da fase gasosa e da temperatura de incubação (FRESHNEY, 2000). Após fixação ao substrato, as células iniciarão o processo de proliferação, ocupando a superfície do recipiente, cuja porcentagem de cobertura pelas células denomina-se confluência. Objetivando a manutenção de cultivos celulares saudáveis, a passagem de células, processo de divisão do cultivo celular em dois ou mais subcultivos, é realizada com 50-80% de confluência. Ademais, visando o fornecimento adequado de nutrientes, a troca do meio de cultivo ocorre a cada 2-3 dias (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016).

A passagem de células seguiu o seguinte protocolo:

01. Retirar o meio de cultivo presente na placa. Antes de retirar o meio de cultivo, lavar a mesma (3x) com a solução presente, utilizando pipeta Pasteur;
02. Lavar as placas (2x) com PBS;
03. Preencher a placa com solução de tripsina + EDTA. O volume deve ser o suficiente para o preenchimento completo da superfície da placa;
04. Manter as placas contendo a solução de tripsina + EDTA por 3 a 4 minutos (desprendimento químico), durante esse período deverá ser feitas moderadas batidas (desprendimento mecânico) visando desagregar as células da superfície. Este procedimento deverá ser acompanhado por observações em lupa, com o objetivo de verificar a eficiência do mesmo;
05. Adicionar 3 mL de meio de cultivo às placas para a inativação da ação da tripsina. A quantidade de meio de cultivo a ser adicionada deverá ser no mínimo igual à quantidade de tripsina presente;
06. Lavar as placas com a solução presente e transferir a mesma para tubos falcons de 50 mL.

Repetir o processo;

07. Centrifugar o material coletado a 300 g por 7 – 10 min;

08. Limpar a câmara de Neubauer e a lamínula a ser utilizada com álcool 70%. Em seguida, posicionar a lamínula sobre a área demarcada na câmara de contagem. Utilizar lamínulas especiais que forneçam a profundidade correta da câmara;

09. Identificar as placas que receberão as células com número da passagem e data;

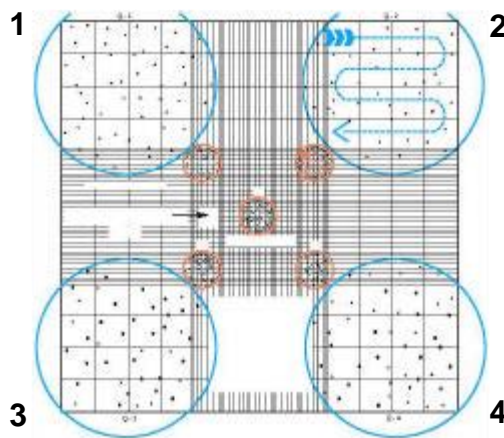
10. Descartar o sobrenadante até volume final de 3 mL;

11. Homogeneizar o *pellet* na solução;

12. Utilizar 10 µL de amostra para contagem das células em câmara de Neubauer, sendo realizado da seguinte maneira:

12.1. Encostando a ponta da pipeta na borda da lamínula, preencher cuidadosamente a câmara de contagem. O líquido deve preencher apenas um lado da câmara e não deve chegar aos canais de cada lado da área de contagem;

12.2. Focalizar a área demarcada da câmara de contagem com a objetiva de menor aumento. Nas áreas 1, 2, 3 e 4, o volume com a lamínula colocada corresponde a $0,1 \text{ mm}^3$;



12.3. Contar as células nas 4 áreas de um lado da câmara de contagem, seguindo o esquema da área 2 e dividir o valor por 4 para obter a média;

12.4. Os valores obtidos são expressos em 10^4 , sendo transformados para 10^5 quando destinados ao subcultivo, para o ajuste da concentração final de células, deverá ser adotado o seguinte cálculo:

$$\begin{aligned} C1 \times V1 &= C2 \times V2 \\ 9,6 \times 10^5 \times 1 &= 10^5 \times V2 \\ V2 &= 9,6 \text{ mL} \end{aligned}$$

12.5. Completar com DMEM+

13. Preencher as placas com meio de cultivo de acordo com os volumes mínimos recomendados menos 1 mL referente a amostra (Ex.: para uma placa petri de 35mm, colocar 3 mL de volume total, sendo 2 mL de meio de cultivo mais 1 mL do meio contendo células;
14. Ao aplicar na placa as amostras, primeiro colocar o meio de cultura e depois colocar as células, evitando que as mesmas possam se aderir à superfície em locais concentrados, fazer a aplicação da amostra por toda a placa;
15. Homogeneizar as placas, sempre em movimentos de 8, pois as mesmas se espalham de forma mais homogênea por toda a superfície da placa;
16. Armazenar em sistema de incubação de 5% CO₂.

5.3.4 Protocolo de avaliação da viabilidade celular pela integridade da membrana celular por coloração com azul de tripan.

O protocolo de avaliação da viabilidade celular por coloração com azul de tripan avalia o número de células viáveis em uma suspensão celular. O método baseia-se na detecção da integridade de membrana celular em células viáveis, já que essas células não permitem a entrada de corantes, tais como, azul de tripan, eosina ou propídio. Por outro lado, células não viáveis (membrana celular rompida) permitem a passagem dos mesmos para o meio intracelular. Portanto, no presente protocolo, células viáveis apresentaram citoplasma não corado e células não viáveis mostraram citoplasma corado (STROBER, 2015).

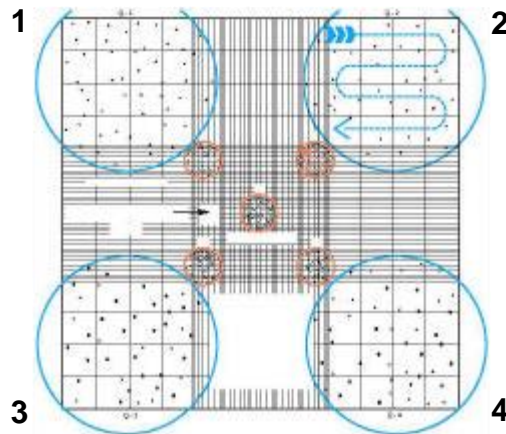
O protocolo de coloração com azul de tripan será descrito a seguir:

01. Repetir os passos 1-11 do protocolo de passagem de células;
02. Homogeneizar a suspensão celular e transferir 0,1 mL para um pequeno tubo de ensaio;
03. Adicionar 0,3 mL de corante azul de tripan 0,2% ao tubo, obtendo-se uma diluição 1:4 (v:v). O corante deverá ser preparado da seguinte maneira:
 - 3.1. Pesar 0,0040 g do azul de tripan, em um microtubo de 1,5-2,0 mL;
 - 3.2. Adicionar PBS para volume final de 1 mL e homogeneizar;
 - 3.3. Conservar a 4° C.
04. Homogeneizar a solução contendo as células + azul de tripan 0,2%;
05. Utilizar 10 µL de amostra para contagem das células em câmara de Neubauer, sendo realizado da seguinte maneira:
 - 5.1. Encostando a ponta da pipeta na borda da lamínula, preencher cuidadosamente a câmara de contagem. O líquido deve preencher apenas um lado da câmara e não deve chegar

aos canais de cada lado da área de contagem;

5.2. Focalizar a área demarcada da câmara de contagem com a objetiva de menor aumento. Nas áreas 1, 2, 3 e 4, o volume com a lamínula colocada corresponde a $0,1 \text{ mm}^3$;

06. Contar as células nas 4 áreas de um lado da câmara de contagem, seguindo o esquema da área 2 e dividir o valor por 4 para obter a média;



07. Para obtenção do número de células/mL, deverá ser feito a seguinte correção:

$$\text{N}^\circ \text{ células/mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de células}}{\text{N}^\circ \text{ de quadrantes contados}} \times 10^4 \times \text{Fator de diluição}$$

Fator de diluição para o exemplo utilizado foi de 4 devido a suspensão inicialmente diluída a 1:4;

08. Realizar a contagem para células viáveis (não coradas) e células não viáveis (coradas em azul);

09. Calcular a razão:

5.1.5 Protocolo de Funcionalidade celular (PDT e Taxa de Crescimento)

01. Preparar o meio de cultivo de células descrito anteriormente (ver tópico 1.1.1.1);

02. Aquecer o meio a $36 \text{ }^\circ\text{C}$;

03. Preparar os tubos a serem transferidos o conteúdo das palhetas:

3.1. Identificar os tubos;

3.2. Completar com 7 mL do meio de cultivo

04. Verificar a localização das palhetas no livro de controle dos botijões (Ver Apêndice);

05. Retirar as palhetas do botijão e descongelar as mesmas em temperatura ambiente;

06. Verificar as informações da palheta, cortar uma das pontas e posicionar a abertura dentro do meio de cultivo antes de cortar a outra ponta;
07. Despejar a amostra no meio de cultivo cortando a outra ponta;
08. Utilizar o pipetador como êmbulo para retirada de possível amostra remanescente na palheta;
09. Homogeneizar a amostra no meio de cultivo;
10. Centrifugar (300g, 7-10min);
11. Descartar o sobrenadante até volume final de 1 mL;
12. Homogeneizar o *pellet* na solução;
13. Realizar contagem de células em câmara de Neubauer de acordo com os passos 5 e 6 do protocolo de avaliação da viabilidade celular por coloração com azul de tripan;

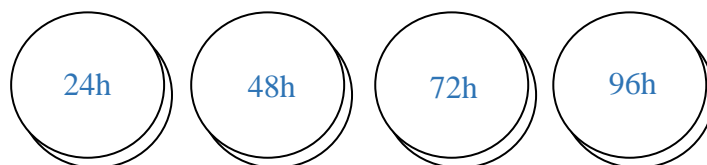
$$\frac{\text{Número de células viáveis}}{\text{Número total de células (Viáveis + Não viáveis)}} \times 100$$

14. Calcular a concentração inicial do cultivo. Exemplo:

$$\begin{aligned} C1 \times V1 &= C2 \times V2 \\ 9,6 \times 10^5 \times 1 &= 10^5 \times V2 \\ V2 &= 9,6 \text{ mL} \end{aligned}$$

Logo, completa-se V1 para 9,6 mL de volume final. Deste modo, a concentração final será de 10^5 células/mL.

15. Colocar 1 mL da suspensão de células (de concentração conhecida) em placas de 35mm contendo 2 mL de DMEM⁺;
16. Realizar as contagens de células em Câmara de Neubauer nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas;



17. Após a última contagem, utilizar a *Cell Calculator++* do programa “Doubling time” (<http://www.doubling-time.com/>) para obtenção do tempo de duplicação e da taxa de crescimento.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O período de vivência de estágio no Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução proporcionou a aquisição de conhecimento teórico e prático das biotécnicas: produção *in vitro* de embriões bovinos e cultivo de fibroblastos, além de imensurável crescimento profissional e pessoal.

O conhecimento de biotécnicas relacionadas a reprodução animal, tais como, a inseminação artificial, a produção *in vitro* de embriões, a transgenia, a clonagem, dentre outros, é de suma importância para o profissional zootecnista, tendo em vista a utilização das mesmas para o aumento da produtividade dos rebanhos, para a melhoria da qualidade do produto final, bem como da elucidação de eventos biológicos.

REFERENCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. **Perfil da Pecuária no Brasil – Relatório Anual 2016**. Disponível em: <<http://www.crbpz.org.br/PortalUploads/Docs/1256.pdf>>. Acesso em: 31 de novembro de 2016.

BENTO, Marco Antonio Furlanetto; SILVA, Vanessa Armelini Procópio; ALVIM, Nivaldo Cesar. Clonagem de Animais. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. 4.ed. ISSN 1679-7353.

BORDIGNON, Vilceu. Clonagem Animal por Transferência Nuclear. In: GONÇALVES, Paulo Bayard Dias; FIGUEIREDO, José Ricardo de; FREITAS, Vicente José de Figueirêdo. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008, p.347-364.

BRACKETT, Benjamin G.; OLIPHANT, Gene. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 12, n. 2, p. 260-274, 1975.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano mais pecuária. Assessoria de Gestão Estratégica. Brasília, 2014. p. 32.

CAMPBELL, K. H. S.; FISHER, P.; CHEN, W.C., CHOI, I.; KELLY, R.D.W.; LEE, J-H.; XHU, J. Somatic cell nuclear transfer: past, present and future perspectives. **Theriogenology**, v. 68, p. S214-S231, 2007.

CANCADO, Rodolfo D. Sobrecarga e quelação de ferro na anemia falciforme. **Rev. bras. hematol. hemoter**, v. 29, n. 3, p. 316-326, 2007.

CAVALIERI, F. L. B.; ANDREAZZI, M. A.; COLOMBO, A. H. B.; EMANUELLI, I. P.; MORESKI, D. A. B.; SILVA, W. M. Estudo sobre o cultivo in vitro de embriões bovinos durante o transporte. **Ars Veterinaria**, v. 31, n. 1, p. 07-11, 2015.

COUTINHO, Luiz Lehmann; ROSÁRIO, Millor Fernandes do; JORGE, Erika Cristina. Biotecnologia animal. **estudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 123-147, 2011.

FRESHNEY, R. Ian. **Culture of Animal Cells Set: CD-ROM and Culture of Animal Cells**. Wiley, 2000. ISBN 9780471388760. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=s8SWHAAACAAJ>>.

GONÇALVES, Paulo Bayard Dias; OLIVEIRA, Marcos Antônio Lemos de; MEZZALIRA, Alceu; MONTAGNER, Marcelo Marcos; VISINTIN, José Antônio; COSTA, Luís Fabiano Santos da. Produção *In Vitro* de Embriões. In: GONÇALVES, Paulo Bayard Dias; FIGUEIREDO, José Ricardo de; FREITAS, Vicente José de Figueirêdo. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008, p.261-291.

GORDON, Ian. **Laboratory production of cattle embryos**. CABI, 2003.

HUNZICKER-DUNN, Mary; MAYO, Kelly. Gonadotropin Signaling in the Ovary. In: KNOBIL, Ernst; NEILL, Jimmy D. **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. Gulf Professional Publishing, 2006, p. 547-592.

JAMEEL, Tahir. Sperm swim-up: a simple and effective technique of semen processing for intrauterine insemination. **JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 58, n. 2, p. 71, 2008.

LEÓN-QUINTO, Trinidad; SIMÓN, Miguel A.; CADENAS, Rafael; MARTÍNEZ, África; SERNA, Arturo. Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Cryobiology**, v. 68, n. 2, p. 227-233, 2014.

LEÓN-QUINTO, Trinidad; SIMÓN, Miguel A.; SÁNCHEZ, Ángel; MARTÍN, Francisco; SORIA, Bernat. Cryobanking the genetic diversity in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from skin biopsies. Investigating the cryopreservation and culture ability of highly valuable explants and cells. **Cryobiology**, v. 62, n. 2, p. 145-151, 2011.

LIMA-VERDE, Isabel Bezerra; ROSSETTO, Rafael; FIGUEIREDO, José Ricardo Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 35, n. 4, p. 472-482, 2011.

NEVES, Jairo Pereira; MIRANDA, Karina Leite; TORTORELLA, Rodrigo Dorneles. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. 2010.

NIWA, K.; OHGODA, O. Synergistic effect of caffeine and heparin on in-vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. **Theriogenology**, v. 30, n. 4, p. 733-741, 1988.

PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859-869, 1995.

PEREIRA, Luiz Gustavo Ribeiro; ARAUJO, Gherman Garcia Leal de; VOLTOLINI, Tadeu Vinhas; BARREIROS, Diego Cabral. Manejo nutricional de ovinos e caprinos em regiões semiáridas. **Seminário Nordeste de Pecuária**, v. 11, 2007.

RODRIGUES, Marcelo Teixeira. Alimentação de cabras leiteiras. **ENCONTRO NACIONAL PARA O DESENVOLVIMENTO DA ESPÉCIE CAPRINA**, v. 8, p. 121-154, 2004.

SANDOVAL JR., Paulo; OLIVEIRA, Rodrigo Vidal; XIMENES, Fábio Henrique Bezerra; MENDES, Clayton Quirino Mendes. Manual de Criação de Caprinos e Ovinos. 1. ed. Brasília: Codevasf, 2011. 142p.

SILVA, Ana Carolina Japur de Sá; SILVA, Júlio César Rosa; GOMES, Mariana Kefalás Oliveira; REIS, Rosana Maria dos; FERRIANI, Rui Alberto; SÁ, Marcos Felipe Silva de. Aspectos fisiológicos do LH na foliculogênese. **Femina**, v. 34, n. 7, p. 469-476, 2006.

STROBER, Warren. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, p. A3. B. 1-A3. B. 3, 2015.

TAVARES, Silvio Roberto de Lucena. **Remediação de solos e águas contaminadas por metais pesados: Conceitos básicos & Fundamentos**. Rio de Janeiro: 2013.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Handbook of Cell Culture Basics**. 2016.

TIAN, X Cindy; KUBOTA, Chikara; ENRIGHT, Brian; YANG, Xiangzhong. Cloning animals by somatic cell nuclear transfer–biological factors. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 1, p. 1, 2003.

URDANETA, Aixa; JIMÉNEZ-MACEDO, Ana-Raquel; IZQUIERDO Dolors; PARAMIO, Maria-Teresa. Supplementation with cysteamine during maturation and embryo culture on embryo development of prepubertal goat oocytes selected by the brilliant cresyl blue test. **Zygote**, v. 11, n. 04, p. 347-354, 2003.