

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**Avaliação ultraestrutural de ovócitos bovinos maturados *in vitro* associados  
à nanopartículas e levitação magnética.**

Luana Felix Rosa

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Biotecnologia, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau  
de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG  
Julho - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**Avaliação ultraestrutural de ovócitos bovinos maturados *in vitro* associados  
à nanopartículas e levitação magnética.**

Luana Felix Rosa

Marcelo Emílio Beletti

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Biotecnologia, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau  
de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG  
Julho - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**Avaliação ultraestrutural de ovócitos bovinos maturados *in vitro* associados  
à nanopartículas e levitação magnética.**

Luana Felix Rosa

Marcelo Emílio Beletti  
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do Curso de  
Biotecnologia em \_\_/\_\_/\_\_.

Uberlândia - MG  
Julho - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**Avaliação ultraestrutural de ovócitos bovinos maturados *in vitro* associados  
à nanopartículas e levitação magnética.**

Luana Felix Rosa

Aprovado pela Banca Examinadora em: 10 / 07 / 2018 Nota: 90

Marcelo Emílio Beletti  
Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, 10 de Julho de 2018.

## Dedicatória

*Dedico este trabalho às pessoas que mais amo, admiro e respeito.  
Mãe, Pai e Lucas, eu não conseguiria se não fosse vocês.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre esteve presente em cada passo que dei, que enviou pessoas maravilhosas, as quais posso chamar de verdadeiros presentes, para me ajudar, ensinar e aconselhar. Esse Deus que guia meus passos para que eu trilhe o caminho que me levará aos pontos de sucesso que Ele mesmo preparou. O Deus que me levantou de todas as quedas e me mostrou o sentido de “Tudo posso naquele que me fortalece”. Obrigada Pai de eterno amor.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por me conceder a bolsa de Iniciação Científica, permitindo, assim, que o projeto fosse realizado.

Agradeço ao Dr. Marcelo Emílio Beletti por ter aceito a missão de me orientar nesta caminhada. Que enxergou em mim alguém capaz de realizar algo além do “mais do mesmo” e me presenteou com este projeto.

Em especial à Dr. Amanda Nonato, que, além de me ensinar toda a parte prática de um laboratório, é uma grande amiga. Te agradeço, por ter enxergado em uma simples graduanda, a capacidade e o desejo de crescer e aprender cada dia mais e obrigada por confiar e se dispor a me passar seus conhecimentos. Obrigada pelos conselhos, por todos os ensinamentos, pelas conversas, obrigada por essa amizade que levarei para vida toda.

Aos amigos do Laboratório de Biologia da Reprodução Luisa Miglio, que aceitou desenvolver esse projeto ao meu lado, e que se tornou uma grande amiga. Luiz Gruppi, que, sem muito esforço, ganhou meu coração. Muller Carrara, que mesmo com seu jeito meio rústico de ser, tem um coração enorme e está sempre disposto a ajudar e ensinar. Mariana e Lucas por toda a ajuda e amizade.

Agradeço aos Brxs pela amizade ao longo desses quase 5 anos. Em especial ao Raphael Henrique, meu melhor amigo durante toda a graduação. Obrigada por ter me arrastado para cada projeto de extensão realizado, por ter acreditado em mim e pelo companheirismo durante esses 4 anos.

Às amigas que Deus me permitiu construir: Larissa Caroline, Henrique Lara, Yaraline Vilela, Marília Hilário, Matheus Farias, José Henrique, Natália Oliveira, Júlio César, Sávio Borges, Bruno Cruvinel, Marcela Santos, Amanda Cristina e Bruno Fernandes. Acreditem, vocês foram essenciais nesta caminhada. E claro, à Pollyanne Moraes, que, por mais que sejamos primas, nos aproximamos apenas na graduação. Polly, obrigada por sua amizade, por todo seu apoio, pelos conselhos e puxões de orelha, pelos incentivos. Obrigada por alegrar minha vida com seu jeitinho único de ser. Amo você.

Agradeço aos meus pais Anderson Felix e Jeanne Gomes pela educação que me deram, por terem me ensinado a priorizar os estudos. Obrigada por cada “não” já dito. Obrigada por terem construído o meu caráter ao molde de vocês. Vocês são meus exemplos de vida, de luta, de caráter. Se hoje eu cheguei até aqui foi porque eu sempre os tive ao meu lado, não me deixando desistir. Obrigada por sonhar meus sonhos comigo, eles estão se realizando pouco a pouco, mas ainda temos muitos outros para colocar em prática. Eu amo vocês com tudo o que sou.

Ao meu irmão Lucas Felix, meu grande amor. A maior razão de eu nunca desistir dos meus sonhos é o desejo de que você me tenha como exemplo. Tudo o que faço, cada passo que dou, é pensando em ser uma boa influência na sua vida. Eu amo você com todo o meu coração. Tudo o que sou e tudo o que tenho é seu, para sempre.

Aos meus avós maternos Ozório e Sueli, meus maiores exemplos de amor e companheirismo. Aos meus avós paternos Waner e Aparecida e ao meu tio Rogério, meus grandes incentivadores. Essa é a primeira conquista de muitas que ainda virão, e dedico a vocês.

E, por último, agradeço a todos, que, mesmo indiretamente, me ajudaram a superar cada obstáculo dessa primeira (de muitas) jornada.

## RESUMO

Estudos em biotecnologias da reprodução, como a produção *in vitro* de embriões (PIVE), têm buscado atender as necessidades de mulheres que enfrentam a infertilidade, bem como o desenvolvimento zootécnico dos rebanhos brasileiro e mundial. Com isso, têm-se buscado estudar e desenvolver diferentes métodos de maturação *in vitro* a fim de se obter melhores resultados na produção *in vitro* de embriões. Com este estudo, objetivou avaliar por microscopia eletrônica de transmissão, a maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos bovinos em sistema tridimensional (3D) por levitação magnética associada à nanopartículas em diferentes concentrações comparado à produção *in vitro* de embriões (PIVE). Foram realizadas 07 rotinas de PIVE, totalizando a utilização de 686 ovócitos com produção de 252 blastocistos. Foi realizada análise ultraestrutural dos ovócitos maturados em sistema tridimensional de nanopartículas associadas a levitação magnética e comparados à taxa de clivagem e formação de blastocistos. Observou-se que os grupos de ovócitos maturados em sistema bidimensional convencional obtiveram taxas mais satisfatórias de clivagem e blastocistos em relação aos grupos de ovócitos maturados em sistema tridimensional. A área do citoplasma dos ovócitos ocupada por vacúolos foi maior conforme o aumento na concentração de nanopartículas. Assim como a área do citoplasma dos ovócitos ocupada por mitocôndrias decresceu com o aumento da concentração de nanopartículas. Em relação aos grânulos corticais, não foi identificada diferença do grupo controle em relação aos demais grupos. A partir dos resultados obtidos, concluímos que o uso de nanopartículas no cultivo de ovócitos bovinos não atrapalha a fecundação, porém não é vantajoso para a maturação e, conseqüentemente, não contribuem para o desenvolvimento embrionário.

**Palavras chave:** Maturação *in vitro*, ovócitos, nanopartículas.





## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	11
2.1	Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	11
2.1.1	Obtenção e seleção dos ovócitos .....	11
2.1.2	Maturação <i>in vitro</i> .....	11
2.1.3	Fertilização <i>in vitro</i> .....	13
2.1.4	Cultivo <i>in vitro</i> .....	13
2.2	Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	14
2.3	Análise ultraestrutural das imagens obtidas .....	15
2.4	Estatística.....	15
3	RESULTADOS .....	16
3.1	Análise visual ultraestrutural.....	18
4	DISCUSSÃO.....	28
5	CONCLUSÃO.....	31
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	31

## 1 INTRODUÇÃO

Estudos em biotecnologias da reprodução, como a produção *in vitro* de embriões (PIVE), têm buscado atender as necessidades de mulheres que enfrentam a infertilidade por causas variadas como endometriose (Kuroda, et al., 2009) e quimioterapia (Rosendahl, et al., 2010). Da mesma forma, as biotecnologias da reprodução têm sido importantes no desenvolvimento da pecuária brasileira e mundial (Beletti, 2013).

A PIVE se inicia com a obtenção dos ovócitos podendo ser realizada por aspiração *in vivo* ou por aspiração de ovários coletados em abatedouros comerciais. Em seguida, ocorrem três etapas, a maturação *in vitro* de ovócitos (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* de embriões (CIV). Na MIV, ovócitos selecionados recebem estímulos do meio no qual estão inseridos para finalizar a meiose envolvendo alterações nucleares e citoplasmáticas essenciais para a fecundação e, posteriormente, o desenvolvimento embrionário (Dadarwal, et al., 2015), assim, o sucesso da PIVE está diretamente relacionado à qualidade dos ovócitos (Lonergan, et al., 2003) e com o sucesso na MIV por ser a etapa na qual ocorrem eventos primordiais para que ocorra a fecundação (Dadarwal et al., 2015).

A maturação ovocitária está ligada à capacidade do ovócito realizar alterações nucleares e citoplasmáticas para atingir uma completa maturação até estar preparado para ser fecundado e, posteriormente, manter o desenvolvimento do embrião (Mingoti et al., 2002; Sirard, 2001). Essa maturação é dividida em maturação nuclear, que envolve a retomada da meiose em estágio de vesícula germinativa (meiose bloqueada em diplóteno) até a metáfase II onde a meiose é novamente bloqueada, e em maturação citoplasmática, que corresponde a reorganização das organelas no citoplasma e alterações estruturais necessárias. Na maturação citoplasmática a reorganização dos grânulos corticais e das mitocôndrias ocorrem de acordo com a necessidade para os próximos eventos celulares (Mao et al., 2014).

Os grânulos corticais estão dispersos por todo o citoplasma no ovócito imaturo e migram para a periferia do ooplasma após a maturação (Hosoe; Shioya, 1997; Wessel et al., 2001) realizando exocitose após a fecundação para que modificações na matriz extracelular ocorram e impeçam a poliespermia (Haley; Wessel, 2004). As mitocôndrias são encontradas na periferia da vesícula germinativa e ao ser rompida, as mitocôndrias ocupam a maior parte do volume citoplasmático (Dumollard et al., 2006; Brevini et al., 2005; Somfaia et al., 2012), essa migração ocorre para que as necessidades energéticas sejam supridas pela produção de adenosina trifosfato (ATP) requisitadas na quebra da vesícula germinativa, na migração do fuso e na transição da meiose I para a II.

A relevância da maturação *in vitro* de ovócitos imaturos tem aumentado e se apresenta como uma técnica vantajosa na medicina reprodutiva (Shirasawa; Terada, 2017), como, por exemplo, na preservação da fertilidade de mulheres acometidas de câncer (Woodruff, T. K., 2015) e como terapia alternativa para mulheres portadoras da Síndrome do Ovário Policístico (SOP) (Choi et.al; 2012). Além disso, a MIV possui um papel crucial no sucesso da fertilização e desenvolvimento do embrião (Coticchio et al., 2015). Por isso, é necessário se estudar e desenvolver diferentes métodos de maturação *in vitro* a fim de se obter melhores resultados na produção *in vitro* de embriões.

Com o intuito de obter melhores resultados na PIVE, novos sistemas de cultivo vêm sendo estudados. O sistema tradicional é o bidimensional (2D), que é feito em placas em que as células permanecem com uma de suas faces em contato direto com a superfície da placa (Araújo et al., 2014). Já o sistema tridimensional (3D) mimetiza o ambiente natural das células reduzindo a tensão que o complexo ovócito-cumulus sofre quando cultivado em contato direto com a placa (Telfer; McLaughlin, 2012) permitindo que as células recriem suas funções nativas (Tseng et al., 2013). Existem diferentes formas de realizar o cultivo celular em três dimensões: matrizes com componentes naturais como alginato (Dorati, et. al; 2016), matrizes sintéticas como hidrogel de polietileno glicol (PEG) (Green; Shikanov, 2016) e nanopartículas associadas a levitação magnética (Souza et al., 2010). O uso do método de levitação magnética por nanopartículas não é tóxico, não afeta a proliferação celular e não induz resposta inflamatória (Souza et al., 2010), além de apresentar efeitos positivos na proliferação celular e síntese proteica (Souza et al., 2010; Molina et al., 2010).

Segundo Araújo, et al. (2014) e Baerwald (2009) o uso de animais como modelos experimentais tem sido proposto para aprimorar as técnicas aplicadas à ciência reprodutiva, já que pesquisas utilizando material humano enfrentam dificuldades pela escassez de material e barreiras éticas (Fransolet et al., 2014). Estudos realizados demonstram que o sistema tridimensional de cultivo mimetiza o ambiente natural das células, tendo sido utilizado em diversos estudos posteriores como cultura de tecido adiposo (Daquinag et al., 2013), terapia com células tronco (Lin et al., 2016) comprovando que o sistema possibilita interação célula-célula, síntese da matriz extra-celular e a manutenção da viabilidade celular, além disso a microscopia eletrônica de transmissão é o método que permite maior detalhamento do efeito da maturação *in vitro* sobre as estruturas citoplasmáticas e nucleares dos ovócitos. Portanto, com o presente estudo objetivou-se avaliar, por microscopia eletrônica de transmissão, a maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos bovinos em sistema tridimensional (3D) por levitação magnética associada à nanopartículas em diferentes concentrações associada à produção *in vitro* de embriões (PIVE).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Produção *in vitro* de embriões

Foram realizadas 07 rotinas de PIVE, totalizando a utilização de 686 ovócitos, produção de 252 blastocistos, e foram utilizadas 07 doses de sêmen de touro da raça Nelore adquiridas de empresas especializadas. O protocolo de PIVE utilizado foi do Laboratório de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia (Lucio, et al., 2016).

#### 2.1.1 Obtenção e seleção dos ovócitos

Ovários foram coletados a partir de vacas abatidas em abatedouro comercial da cidade de Uberlândia, armazenados em garrafas térmicas contendo solução fisiológica a 37°C e transportados para o laboratório de biologia da reprodução. Após lavar os ovários com solução fisiológica, os mesmos foram mantidos em banho maria a 37°C para aspiração folicular.

Os folículos antrais ovarianos foram aspirados utilizando seringas de 10 mL e agulha 18G. O fluido aspirado foi transferido para tubos de 50 mL para a sedimentação. O sedimento foi depositado em placas de poliestireno de 90 x 15 mm e o rastreamento dos ovócitos foi realizado com auxílio de microscópio estereoscópio. Ovócitos obtidos foram classificados segundo Stojkovic (2001), e divididos em dois grupos, bons e ruins. Ovócitos bons foram aqueles classificados como grau I e II, ou seja, aqueles que apresentavam citoplasma homogêneo, com ausência de vacúolos, distribuição homogênea e altamente presente das células do cumulus e ovócitos também com mais de três camadas de células do cumulus, porém com ooplasma apresentando algumas granulações e coloração heterogênea. Já os ovócitos ruins foram aqueles classificados como grau III cujos citoplasmas apresentavam muitos vacúolos e ausência parcial de células do cumulus ao redor do ovócito.

#### 2.1.2 Maturação *in vitro*

Ovócitos foram lavados uma vez em meio de lavagem TCM 199 HEPES (0,2 mM piruvato sódico, 10 mM HEPES ácido, 10 mM de HEPES sódico, 5 mM bicarbonato de sódio, 83 µg/mL de amicacina, suplementado com 10% de soro fetal bovino) e uma vez em meio de maturação TCM 199 com bicarbonato (0,2 mM piruvato sódico, 26 mM bicarbonato de sódio, 83 µg/mL de amicacina, 1 µg/mL FSH, 5 µg/m LH, suplementado com 10% de soro fetal bovino).

Após lavagens, os ovócitos de cada grupo (bons e ruins) foram transferidos em grupos de 10 para microtubos de 200  $\mu\text{L}$  contendo 100  $\mu\text{L}$  de meio de maturação; sem adição de nanopartículas, sendo o grupo controle, para o cultivo no modelo convencional (sistema 2D), permitindo contato com o fundo da placa; ou com nanopartículas, nas concentrações de 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  e 75  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , que na presença de um drive magnético permitiu a levitação das células (sistema 3D). As nanopartículas utilizadas apresentavam constituição de óxido de ferro, ouro e poli-L-lisina. Desta forma foram compostos os seguintes grupos experimentais: 2D-BOM, 2D-RUIM, 3D50-BOM, 3D50-RUIM, 3D75-BOM E 3D75-RUIM, assim como esquematizado na Figura1.

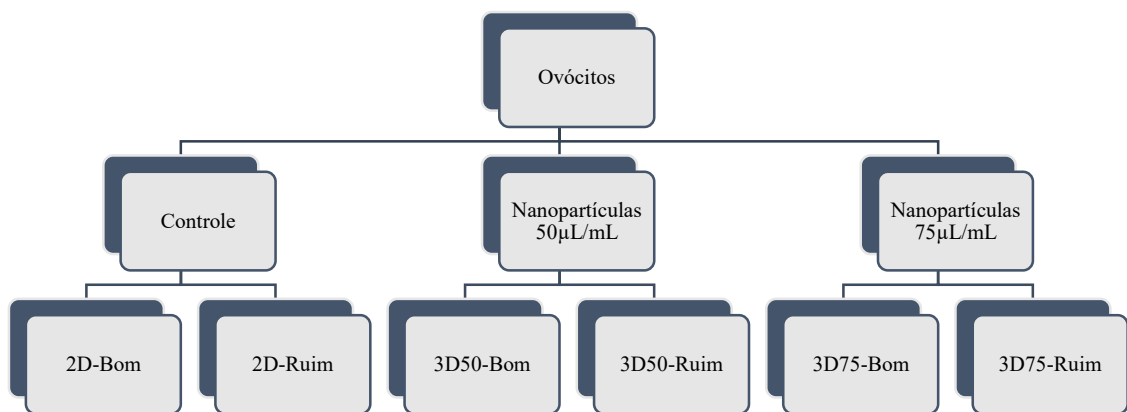


Figura1. Desenho experimental dos grupos formados para realização do experimento. Sendo 2D-Bom: grupo controle cultivado em sistema convencional utilizando ovócitos bons; 2D-Ruim: grupo controle cultivado em sistema convencional utilizando ovócitos ruins; 3D50-Bom: ovócitos bons cultivados em sistema tridimensional utilizando nanopartículas na concentração de 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de meio; 3D50-Ruim: ovócitos ruins cultivados em sistema tridimensional utilizando nanopartículas na concentração de 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de meio; 3D75-Bom: ovócitos bons cultivados em sistema tridimensional utilizando nanopartículas na concentração de 75  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de meio; 3D75-Ruim: ovócitos ruins cultivados em sistema tridimensional utilizando nanopartículas na concentração de 75  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de meio.

Os microtubos contendo os ovócitos em meio de maturação, contendo ou não nanopartículas, foram incubados por 4 h em incubadora a temperatura de 38°C, 5% de  $\text{CO}_2$  em ar e 100% de umidade, a fim de permitir a adesão das nanopartículas às células. Ao término do período de incubação, os ovócitos foram transferidos para uma placa de 24 poços de

poliestireno contendo 500  $\mu\text{L}$  de meio de maturação em cada poço. A placa foi coberta por um drive magnético e mantida na incubadora por mais 18 h. Metade dos ovócitos maturados, de cada grupo, foi coletada para análises de microscopia eletrônica a outra metade foi destinada para a fertilização *in vitro*.

### 2.1.3 Fertilização *in vitro*

Ovócitos maturados foram lavados três vezes em microgotas de 100  $\mu\text{L}$  de meio TALP-Fert (suplementado com 0,2 mM piruvato sódico, 20,4  $\mu\text{M}$  penicilamina, 10,2  $\mu\text{M}$  hipotaurina, 1,97  $\mu\text{M}$  epinefrina, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  heparina, 6 mg/mL BSA e 83  $\mu\text{g}/\text{mL}$  amicacina), e foram transferidos para gotas de 100  $\mu\text{L}$  de meio TALP-Fert cobertas com óleo mineral em placas de poliestireno de 60 x 15 mm.

A fim de selecionar os espermatozoides viáveis, uma dose de sêmen, de touro com fertilidade comprovada, foi descongelada em banho maria a 37°C por 30 segundos e foi depositada sobre um mini gradiente de Percoll, preparado previamente em um microtubo de 1,5 mL composto por uma camada de Percoll 45% (200  $\mu\text{L}$  de Percoll 90% e 200  $\mu\text{L}$  de meio TALP-Sperm (Tyrode's-albumina-lactato-piruvato, acrescido de 0,2 mM piruvato sódico e 83  $\mu\text{g}/\text{mL}$  amicacina)) e uma camada de 400  $\mu\text{L}$  de Percoll 90% (Percoll, solução 10x, solução estoque  $\text{CaCl}_2$ , solução estoque  $\text{MgCl}_2$ , DL-ácido láctico e bicarbonato de sódio). O minigradiente foi centrifugado a 3500rpm por 5 minutos e o sedimento formado foi transferido para outro microtubo contendo 1000  $\mu\text{L}$  de meio TALP-Sperm, após a homogeneização, foi feita a segunda centrifugação a 3500rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foi acrescido o mesmo volume de meio TALP-Fert (1:1 sedimento:meio). Após avaliação de motilidade e concentração, adicionou-se à cada gota contendo os ovócitos,  $1 \times 10^5$  espermatozoides, em seguida foram incubados por 18 h a temperatura de 38°C e 5%  $\text{CO}_2$  em ar e 100% de umidade.

### 2.1.4 Cultivo *in vitro*

Os prováveis zigotos foram desnudados mecanicamente por pipetações sucessivas e foram lavados por 3 vezes em gotas de 100 $\mu\text{L}$  de meio SOF (acrescido de 0,2 mM piruvato sódico, 5 mg/mL BSA, 2,5% de soro fetal bovino e 83  $\mu\text{g}/\text{mL}$  amicacina) e transferidos para gotas de 100  $\mu\text{L}$  de meio SOF cobertas com óleo mineral em placas de poliestireno de 60 x 15 mm, e foram cultivados por 6 dias. A taxa de clivagem em relação ao número total de ovócitos utilizados foi avaliada, 48 h após a fecundação *in vitro*, por meio da avaliação das estruturas que apresentavam duas ou mais células. Sete dias após a fecundação, a taxa de blastocistos em

relação ao número total de ovócitos utilizados foi avaliada a partir da contagem de estruturas que alcançaram esse estágio de desenvolvimento.

## **2.2 Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Após a maturação, ovócitos de cada grupo foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato a 0,1 M e pH 7,4 por 30 min e armazenados em microtubos de 1,5 mL contendo 500 µL de solução de PBS com 2% de soro fetal bovino. Os microtubos foram armazenados a 4°C até o dia do preparo da amostra para a análise.

No dia em que as amostras foram preparadas para a análise, cada microtubo foi submetido à centrifugação a 70g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e, para remoção dos fixadores, o volume do microtubo foi recomposto com solução tampão fosfato pH 7,4 (PBS) e foi feita uma agitação para lavagem do material. Foi realizada uma segunda centrifugação a 70g por 5 min, e o sobrenadante foi descartado, este procedimento foi repetido por três vezes. Posteriormente, foram adicionados 500 µL de solução de tetróxido de ósmio a 1% e após 30 min foram realizadas três lavagens com PBS para retirada do ósmio. Ao precipitado de células obtido, foi adicionado ágar 3% a 50°C até completar o volume máximo do microtubo e foi feita homogeneização para introduzir o ágar entre as células, mas mantendo-as no fundo do microtubo. Posteriormente, os microtubos foram mantidos a 4°C até a solidificação do ágar.

O material incluído em ágar foi retirado do microtubo e partido em fragmentos de 1 mm<sup>3</sup>. Os fragmentos foram colocados em frascos de vidro de 5 mL e desidratados por 5 min em banhos com solução de concentrações crescentes de álcool (50%, 70%, 80%, 90% e 95%) e em seguida, três banhos de 10 min em álcool 100% e três banhos de 10 minutos em óxido de propileno 100%. Após os banhos, foi adicionada solução de resina Epon EMS (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, UK) com duas partes de óxido de propileno e uma parte de resina (solução 2:1) em quantidade suficiente para cobrir toda a amostra e as mesmas foram incubadas por 12 h (overnight) nessa solução em vidros de 5 mL tampados e vedados com parafilm. Após as 12 h, a solução 2:1 foi descartada e então foi adicionada nova solução na concentração de 1:1 de óxido de propileno e resina. O recipiente foi novamente tampado, vedado com parafilm e deixado a temperatura ambiente por mais 12 h. Em seguida, os vidros com as amostras foram destampados e levados a estufa 37°C por 12 h para que o óxido de propileno evaporasse. Após esta etapa, a solução de óxido de propileno e resina Epon foi descartada e adicionou-se solução de resina pura suficiente para cobrir toda a amostra e os vidros foram colocados de volta na estufa 37°C inclinados 45° por 3 horas. A resina foi novamente retirada e o material foi transferido para formas, sendo um fragmento por orifício,



devidamente identificado. Posteriormente, foi adicionada solução de resina Epon pura até completar os orifícios e a forma foi mantida em estufa à temperatura de 60°C por 72 h.

Após solidificação (polimerização) em estufa, os blocos foram retirados das formas, desbastados e, então o material foi cortado com ultramicrotomo Reichert-Jung (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA). Os cortes entre 60 e 90 nm de espessura foram colocados em telas de cobre (Mesh Square 200 lines/inch, Electron Microscopy Sciences) e contrastados em acetato de uranila (3%) e citrato de chumbo (1%) conforme descrito por Bozzola e Russel (1998). Os cortes foram analisados em microscópio eletrônico de transmissão (Hitachi HT 7700) e as imagens foram capturadas nos aumentos de 10 mil a 30 mil vezes. As estruturas fotografadas foram mensuradas com o auxílio do programa Image J (National Institutes of Health, USA). As áreas das estruturas, mitocôndrias, vacúolos e grânulos corticais foram medidas e comparadas com a área total do ovócito. Também foi feita uma avaliação de distribuição de cada estrutura a partir da observação visual das imagens obtidas no microscópio eletrônico de transmissão. As imagens demonstradas neste trabalho foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão Hitachi HT 7700.

### **2.3 Análise ultraestrutural das imagens obtidas**

Foram capturadas imagens dos ovócitos destinados à microscopia eletrônica de transmissão com ampliação de 10.000; 20.000 e 30.000 vezes. As imagens com ampliação de 30.000 vezes foram analisadas utilizando-se o software Image-J, onde foram mensuradas as porcentagens da área ocupada por mitocôndrias, vacúolos e grânulos corticais no citoplasma dos ovócitos de cada grupo.

As imagens panorâmicas (10.000x), ou seja, imagens de maior cobertura da superfície do ovócito, e as imagens capturadas no aumento de 20.000x foram utilizadas para se realizar uma análise visual ultraestrutural do ovócito. Observou-se a dispersão e localização das mitocôndrias; dispersão, localização e eletrondensidade de grânulos corticais e vacúolos; dispersão das microvilosidades e a presença de artefatos encontrados foram avaliados e pontuados de acordo com sua quantidade.

### **2.4 Estatística**

Foi verificada a distribuição normal da amostra pelo teste Kolmogorov Smirnov. Posteriormente, foi aplicado o teste ANOVA ONE WAY com pós teste t student para verificar diferenças na média entre os grupos, utilizando o programa Action.

### 3 RESULTADOS

As taxas de clivagem e de blastocistos estão demonstradas na Tabela 1. O grupo 2D-Bom e os grupos 3D50-Bom e 3D75-Bom apresentaram os melhores resultados de taxas de clivagem, não apresentando diferença entre eles. O grupo 3D75-Ruim obteve taxa de clivagem superior ao grupo controle 2D-Ruim. Enquanto que o grupo 3D50-Ruim não apresentou diferença em relação ao grupo controle. No entanto, o grupo 3D75-Ruim, apesar da maior concentração de nanopartículas, não apresentou diferença com o grupo 3D50-Ruim.

Em relação a taxa de blastocistos, os melhores grupos foram o 2D-Bom e o 3D75-Bom sendo que entre eles não houve diferença e, ambos alcançaram resultados melhores que o grupo 3D50-Bom. Não houve diferença significativa entre o grupo 2D-Ruim e os grupos 3D50-Ruim e 3D75-Ruim na taxa de blastocistos.

**Tabela 1.** Taxas de clivagem e de produção de blastocistos sobre ovócitos bovinos maturados nos sistemas de cultivo bidimensional (2D-Controle) e tridimensional (3D) por levitação com diferentes concentrações de nanopartículas.

TRATAMENTOS	CLIVAGEM (%)	BLASTOCISTO(%)
2D-Bom	83,24 <sup>AB</sup> ± 8,77	61,13 <sup>A</sup> ± 20,38
2D-Ruim	63,72 <sup>C</sup> ± 7,94	39,43 <sup>B</sup> ± 8,12
3D50-Bom	79,20 <sup>ABD</sup> ± 9,00	44,12 <sup>B</sup> ± 17,77
3D50-Ruim	65,68 <sup>CDE</sup> ± 15,81	36,88 <sup>B</sup> ± 17,10
3D75-Bom	86,26 <sup>A</sup> ± 7,59	57,95 <sup>A</sup> ± 9,26
3D75-Ruim	76,78 <sup>BE</sup> ± 9,55	41,28 <sup>B</sup> ± 10,84

<sup>A,B,C,D,E</sup> Letras distintas na mesma coluna diferem entre si (P < 0,05).

Para avaliar a influência do método de maturação *in vitro* associado à nanopartículas e levitação magnética em relação às organelas, foi realizada uma avaliação ultraestrutural a partir da análise da área dos ovócitos ocupada por mitocôndrias, vacúolos e grânulos corticais (Tabela 2). Os grupos de ovócitos com maior área ocupada por mitocôndrias foram os grupos 2D-Bom

e 3D50-Bom, sendo que não houve diferença entre eles. No entanto, ambos apresentaram resultados melhores que o grupo 3D75-Bom. Entre os grupos realizados com ovócitos ruins (2D-Ruim, 3D50-Ruim e 3D75-Ruim) não houve diferença nos resultados.

Em relação a análise da área ocupada por vacúolos, o grupo 2D-Bom não apresentou diferença com o grupo 3D50-Bom, porém ambos apresentaram resultados mais satisfatórios em relação ao grupo 3D75-Bom. Não houve diferença entre o grupo 2D-Ruim e o grupo 3D75-Ruim. No entanto, ambos apresentaram resultados menos satisfatórios em relação ao grupo 3D50-Ruim.

Ao se analisar a área dos ovócitos ocupada por grânulos corticais, a análise estatística mostra que o grupo 2D-Bom não apresentou diferença em relação aos grupos 3D50-Bom e 3D75-Bom, no entanto, houve diferença entre os grupos 3D50-Bom e 3D75-Bom, sendo que o grupo com 75  $\mu\text{L/mL}$  de nanopartículas apresentou maior área ocupada por grânulos. Não houve diferença entre o grupo 2D-Ruim e o grupo 3D50-Ruim, porém ambos apresentaram melhores resultados em comparação ao grupo 3D75-Ruim. A partir da análise estatística não foram encontradas diferenças entre os grupos 2D-Bom e 2D-Ruim, assim como também não foram encontradas diferenças entre os grupos 3D50-Bom e 3D50-Ruim. Já entre os grupos 3D75-Bom e 3D75-Ruim, houve diferença, sendo que o primeiro apresentou ovócitos com maior área ocupadas por grânulos.

**Tabela 2.** Área porcentual mitocôndrias, vacúolos e grânulos corticais dos ovócitos bovinos maturados *in vitro* nos sistemas de cultivo bidimensional (2D-Controle) e tridimensional (3D) por levitação com diferentes concentrações de nanopartículas-

TRATAMENTOS	MITOCÔNDRIA(%)	VACÚOLO(%)	GRÂNULO(%)
2D-Bom	11,06 <sup>A</sup> ± 0,70	7,59 <sup>A</sup> ± 1,07	0,64 <sup>ABC</sup> ± 0,32
2D-Ruim	8,64 <sup>B</sup> ± 2,67	14,74 <sup>B</sup> ± 3,86	0,79 <sup>A</sup> ± 0,33
3D50-Bom	10,43 <sup>AD</sup> ± 1,76	9,38 <sup>A</sup> ± 3,93	0,51 <sup>BC</sup> ± 0,20
3D50-Ruim	8,73 <sup>BD</sup> ± 3,10	9,21 <sup>A</sup> ± 3,96	0,96 <sup>AC</sup> ± 0,72
3D75-Bom	6,48 <sup>CE</sup> ± 2,24	13,98 <sup>B</sup> ± 7,24	1,48 <sup>A</sup> ± 2,00
3D75-Ruim	6,45 <sup>BE</sup> ± 2,71	18,26 <sup>B</sup> ± 5,87	0,39 <sup>B</sup> ± 0,10

<sup>A,B,C,D,E</sup> Letras distintas na mesma coluna diferem entre si (P < 0,05).

### 3.1 Análise visual ultraestrutural

Na análise visual ultraestrutural dos ovócitos, observou-se a dispersão e localização das mitocôndrias; dispersão, localização e eletrondensidade de grânulos corticais e vacúolos (Tabela 3); dispersão das microvilosidades e, os artefatos encontrados foram avaliados e pontuados de acordo com sua quantidade (Tabela 4). Uma foto de cada grupo foi capturada em microscópio eletrônico de transmissão com o intuito de ilustrar a análise ultraestrutural (Figuras 2-14).

Os grupos 2D-Bom e 3D50-Bom, aparentemente, se assemelham na quantidade de mitocôndrias que estão localizadas e homoganeamente dispersas na periferia do ovócito, ao contrário do grupo 3D75-Bom que apresenta, visualmente, menor quantidade de mitocôndrias, sendo que essas se concentram no centro do citoplasma formando clusters (aglomerados). Os grupos 2D-Ruim, 3D50-Ruim e 3D75-Ruim se assemelham quanto à distribuição das mitocôndrias que estão localizadas, em sua maioria, próximo à periferia do ovócito. Em particular, o grupo 3D50-Ruim apresenta mitocôndrias localizadas próximo aos vacúolos. Além disso, os grupos apresentam, provavelmente, menor quantidade de mitocôndrias em relação aos grupos compostos por ovócitos bons.

Os grupos 2D-Bom, 3D50-Bom e 3D75-Bom apresentaram quantidade visualmente semelhante de grânulos corticais. Porém, entre eles, o grupo 2D-Bom apresenta maior homogeneidade em relação a eletrondensidade dos grânulos. Nos três grupos, os grânulos estão distribuídos formando um alinhamento na periferia do ovócito, deixando o centro do citoplasma livre. No entanto, o grupo 3D75-Bom apresenta formação de clusters. Quanto aos grupos compostos por ovócitos ruins, o grupo 2D-Ruim, ao que parece, se assemelha na quantidade de grânulos com o grupo 3D50-Ruim, sendo que ambos, aparentemente, apresentam maior quantidade de grânulos que o grupo 3D75-Ruim. Nos três grupos os grânulos estão localizados próximo à superfície do ovócito formando um alinhamento com a membrana, com exceção do grupo 3D50-Ruim que apresenta formação de clusters. Os grânulos corticais observados nos três grupos apresentam eletrondensidade variada (ou heterogênea) e os grupos 2D-Ruim e 3D50-Ruim apresentam variação notável no tamanho dos grânulos.

Os vacúolos do grupo 2D-Bom aparecem sempre associados às mitocôndrias. Já os grupos 3D50-Bom e 3D75-Bom apresentam, ao que se pôde observar, maior quantidade de vacúolos não associados às mitocôndrias. Nos três grupos, os vacúolos estão localizados no centro do citoplasma. O grupo 2D-Ruim visualmente apresenta o dobro de vacúolos em relação ao grupo 2D-Bom sendo que estes, se apresentam formando clusters. O grupo 3D50-Ruim em

comparação ao grupo 2D-Ruim, visivelmente, apresenta menor quantidade de vacúolos e estes estão dispersos de forma mais homogênea formando poucos clusters. O grupo 3D75-Ruim se assemelha à quantidade de vacúolos do grupo 3D50-Ruim, porém apresenta organização em clusters formados sem presença de mitocôndrias e localizados próximo à periferia do ovócito.

**Tabela 3.** Análise visual da dispersão, localização e eletrondensidade das mitocôndrias, vacúolos e grânulos corticais de ovócitos bovinos maturados *in vitro* nos sistemas de cultivo bidimensional (2D-Controle) e tridimensional (3D) por levitação com diferentes concentrações de nanopartículas.

GRUPOS	MITOCÔNDRIAS	GRÂNULOS	VACÚOLOS
2D-Bom	Aparentemente, Grande quantidade. Formam clusters.	Encontrados em maior quantidade. Localizados adjacentes à membrana, distantes do centro do citoplasma. Em sua maioria, encontrados formando clusters. Poucos são encontrados isoladamente. Eletrondensidade homogênea	Encontrados associados às mitocôndrias. Onde não há mitocôndria, não há vacúolos. Formam clusters, apresentando eletrondensidade variada.
2D-Ruim	Menor quantidade de mitocôndrias em relação ao 2DB.	Localizados próximos à membrana. Apresentam eletrondensidades diferentes. Não formam clusters. Formam um alinhamento que acompanha superfície. Alguns são encontrados dispersos fora do alinhamento.	Encontrados formando clusters. Apresenta, visualmente, o dobro de vacúolos em relação ao grupo 2DB.
3D50-Bom	Quantidade de mitocôndrias, visualmente, semelhante ao 2DB	Apresentam densidade variada. Formam um alinhamento. Há uma área considerável sem grânulos. Não formam clusters.	Quantidade aparentemente maior que o 2D-Bom e menor que o 2D-Ruim. Apresenta formação de clusters e alguns vacúolos dispersos.
3D50-Ruim	Visualmente, menor quantidade, em relação aos grupos com ovócitos bons. Em algumas áreas as mitocôndrias encontram-se bem próximas aos vacúolos.	Apresentam densidade variada. Formam clusters que estão distribuídos paralelos à superfície. Apresentam grânulos dispersos e não alinhados à superfície. Apresenta, visivelmente, quantidade semelhante ao grupo 2D-Ruim Não apresenta distribuição no centro do citoplasma.	Vacúolos, em sua maioria, espalhados não formando clusters. Poucos vacúolos formam clusters. Quantidade, aparentemente, semelhante ao 3D50-Bom.

3D75-Bom	Visualmente, menor quantidade de mitocôndrias. Formam pequenos clusters. Com concentração no centro do citoplasma.	Quantidade de grânulos, visualmente, semelhante ao 2DB. Formam clusters alinhados à superfície. Apresentam uma distribuição heterogênea.	Vacúolos dispersos no citoplasma. Grande quantidade de vacúolos. Se concentram no centro do citoplasma.
3D75-Ruim	Mitocôndrias em menor quantidade.	Localizados alinhados à superfície. Pouca quantidade de grânulos. Não formam clusters.	Apresenta clusters formados apenas por vacúolos. Maior quantidade em relação ao 3D75-Bom.

A partir das imagens obtidas no microscópio eletrônico de transmissão, também foi possível identificar e analisar as microvilosidades dos ovócitos. Os grupos 3D50-Bom e 3D75-Bom apresentam dispersão heterogênea dos microvilos e, visualmente menor quantidade dessas estruturas. Em contrapartida o grupo controle 2D-Bom apresenta microvilos dispersos de maneira a preencher quase todo o espaço perivitelínico, portanto, ao que tudo indica, a quantidade dessas estruturas é maior neste grupo.

O grupo controle 2D-Ruim e o grupo 3D50-Ruim apresentam, quantidade de microvilos visualmente semelhante. Além disso, também se assemelham na distribuição das microvilosidades, sendo essa, heterogênea. Ao contrário do grupo 3D75-Ruim que apresenta uma distribuição homogênea, porém, visualmente em menor quantidade em relação aos outros dois grupos citados. Nas imagens também foram identificados artefatos que não pertencem à célula. Em relação a eles, dentre todos os grupos, o grupo controle 2D-Bom é o grupo que, visualmente, apresenta maior quantidade, se apresentando em uma distribuição homogênea pelo citoplasma do ovócito. O grupo 3D75-Ruim apresenta quantidade ínfima de artefatos. Os grupos 2D-Ruim e 3D50-Ruim aparentemente se assemelham na quantidade de artefatos presentes, sendo pouco superior ao grupo 3D75-Ruim. E os grupos 3D50-Bom e 3D75-Bom visualmente apresentam quantidade intermediária de artefatos em relação aos demais grupos.

**Tabela 4.** Análise visual da distribuição e quantidade aparente de microvilos e artefatos encontrados em ovócitos bovinos maturados *in vitro* nos sistemas de cultivo bidimensional (2D-Controle) e tridimensional (3D) por levitação com diferentes concentrações de nanopartículas.

GRUPO	MICROVILOSIDADES	ARTEFATOS
2D-Bom	Microvilos irregulares. Não tão densos. Dispersos preenchendo quase todo o espaço perivitelínico.	Nota: 5 Grande quantidade e distribuídos homogeneamente.
2D-Ruim	Menor quantidade de microvilos. Dispersos. Distribuídos de maneira irregular.	Nota: 1 Apresenta praticamente nenhum artefato.
3D50-Bom	Microvilos escassos em relação ao 2D-Bom. Algumas regiões preservadas. Outras regiões com poucos microvilos. Distribuídos de forma heterogênea na superfície.	Nota:2 Apresenta poucos artefatos.
3D50-Ruim	Apresentam menor quantidade em relação ao 2D-Bom e o 3D50-Bom. Regiões com distribuição heterogênea.	Nota:1 Apresenta pouquíssimos artefatos.
3D75-Bom	Apresenta áreas ricas e áreas pobres em microvilos. Distribuição heterogênea.	Nota: 3 Apresenta alguns artefatos. Distribuição homogênea.
3D75-Ruim	Microvilos de baixa altura. Pouca quantidade de microvilos. Distribuição homogênea.	Nota: 0 Muito raros.

Nota 0: Artefatos muito pouco presentes.

Nota 5: Artefatos muito presentes.

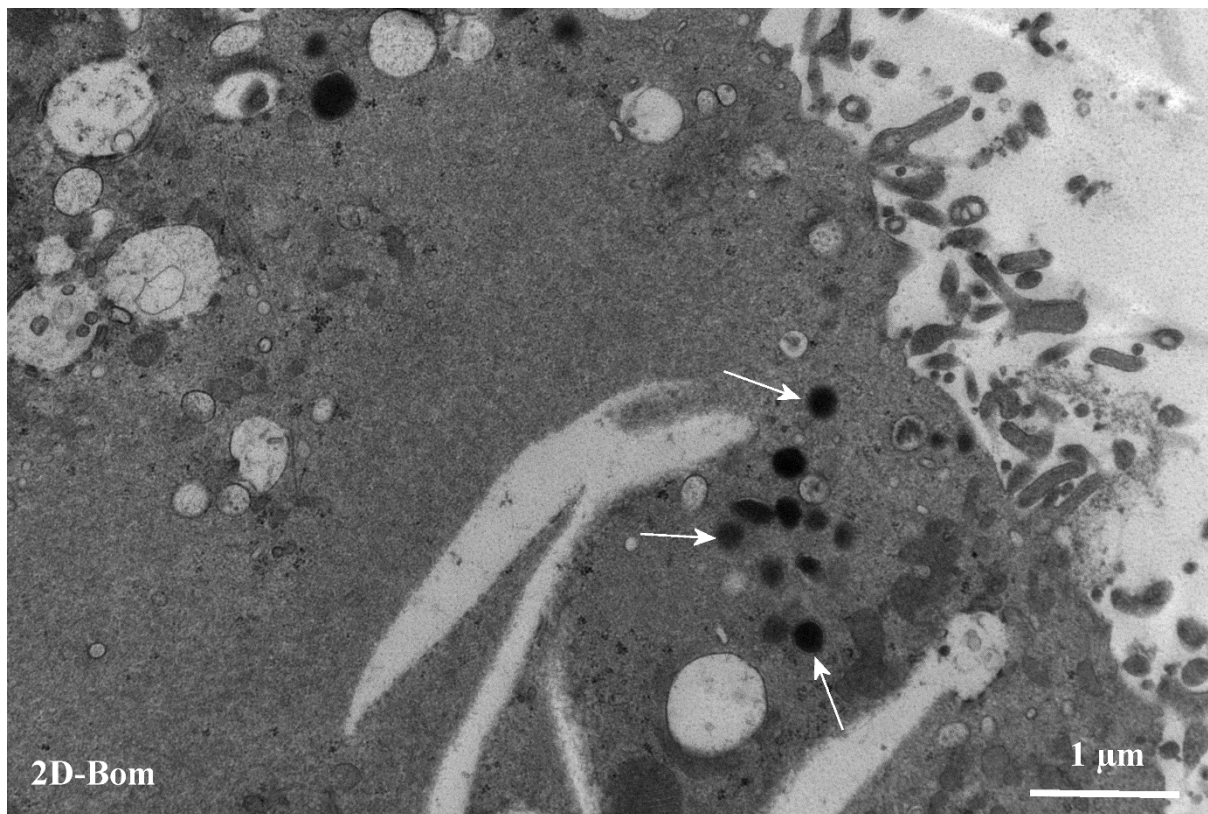


Figura 2. Eletromicrografia do citoplasma de ovócitos indicando grânulos corticais do grupo 2D-Bom



Figura 3. Eletromicrografia do citoplasma de ovócitos indicando mitocôndrias do grupo 2D-Bom



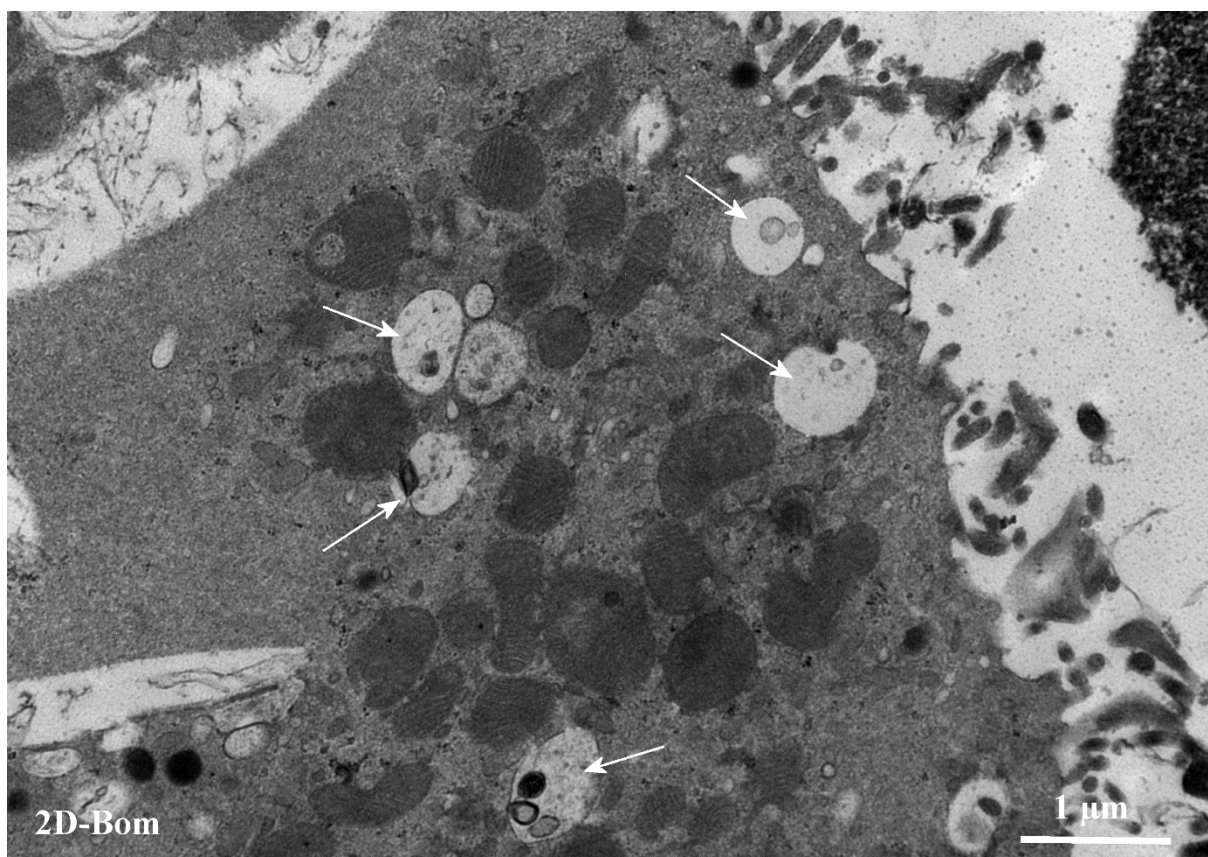


Figura 4. Eletromicrografia do citoplasma de ovócitos indicando vacúolos do grupo 2D-Bom

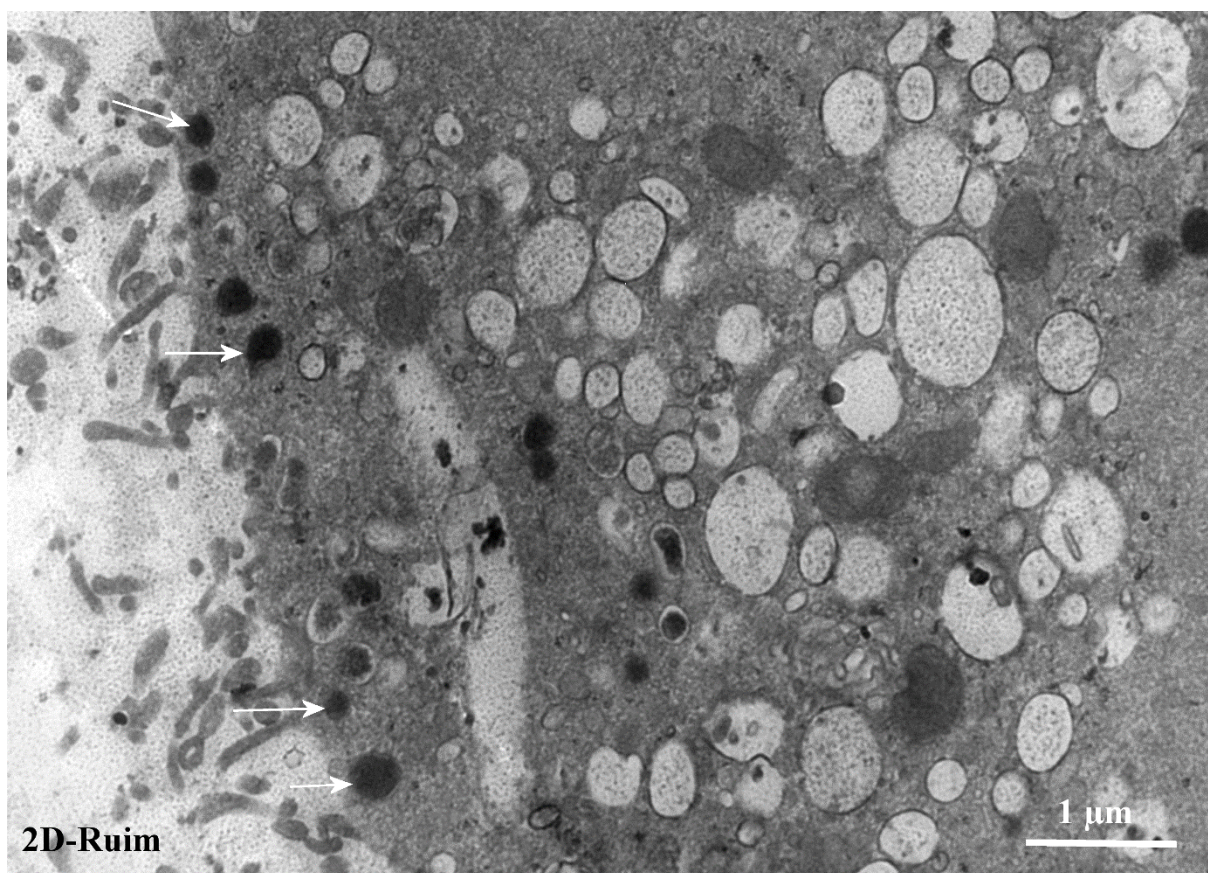


Figura 5. Eletromicrografia do citoplasma de ovócitos indicando grânulos corticais do grupo 2D-Ruim

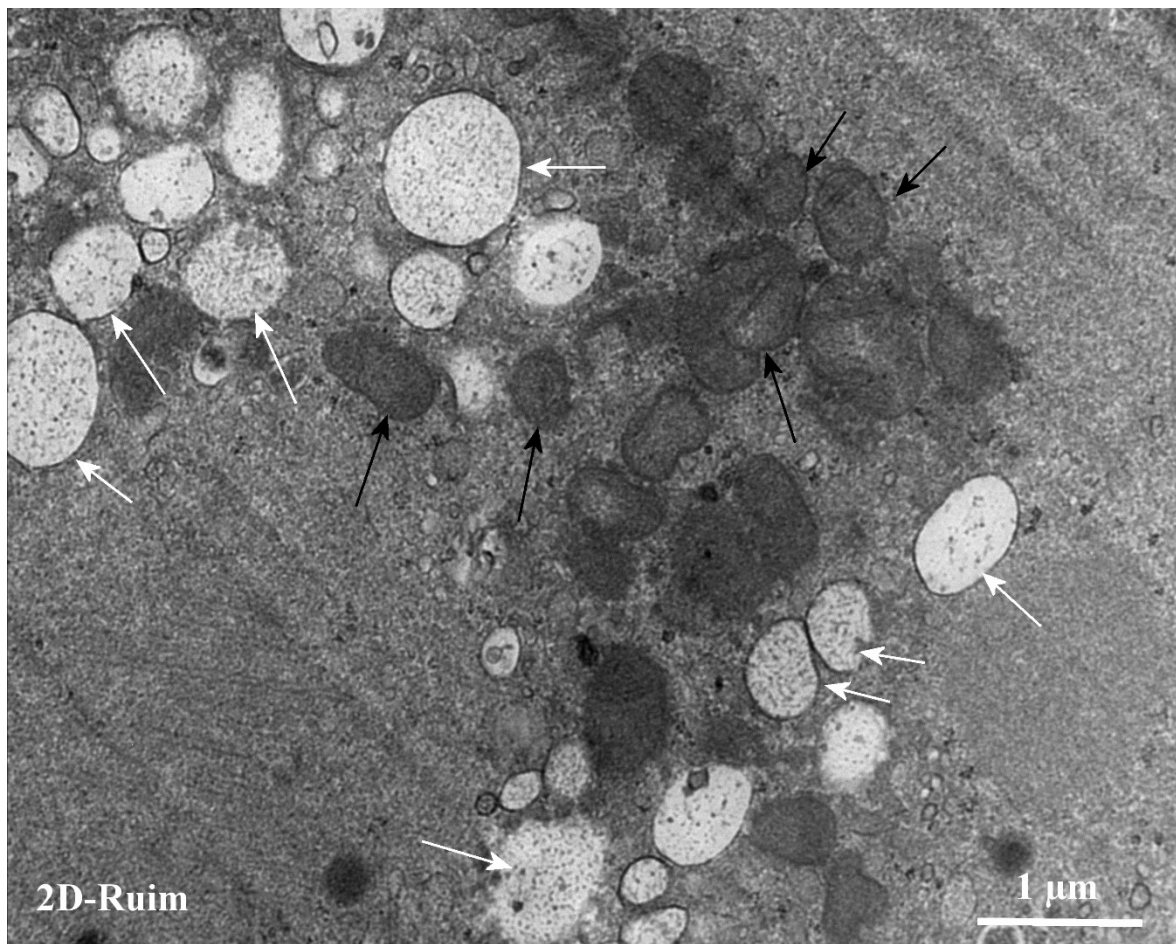


Figura 6. Eletromicrografia do citoplasma de ovócitos indicando vacúolos (setas brancas) e mitocôndrias (setas pretas) do grupo 2D-Ruim

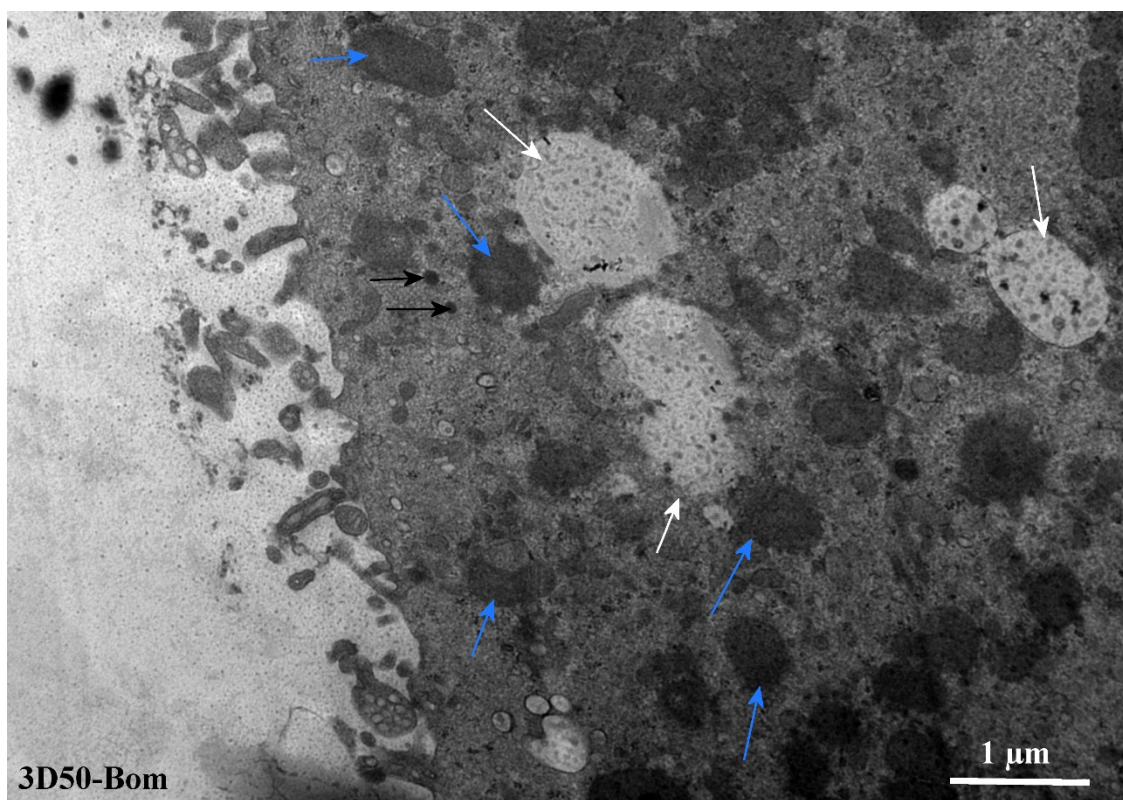


Figura 7. Eletromicrografia do citoplasma de ovócitos indicando grânulos corticais (setas pretas), vacúolos (setas brancas) e mitocôndrias (setas azuis) do grupo 3D50-Bom.

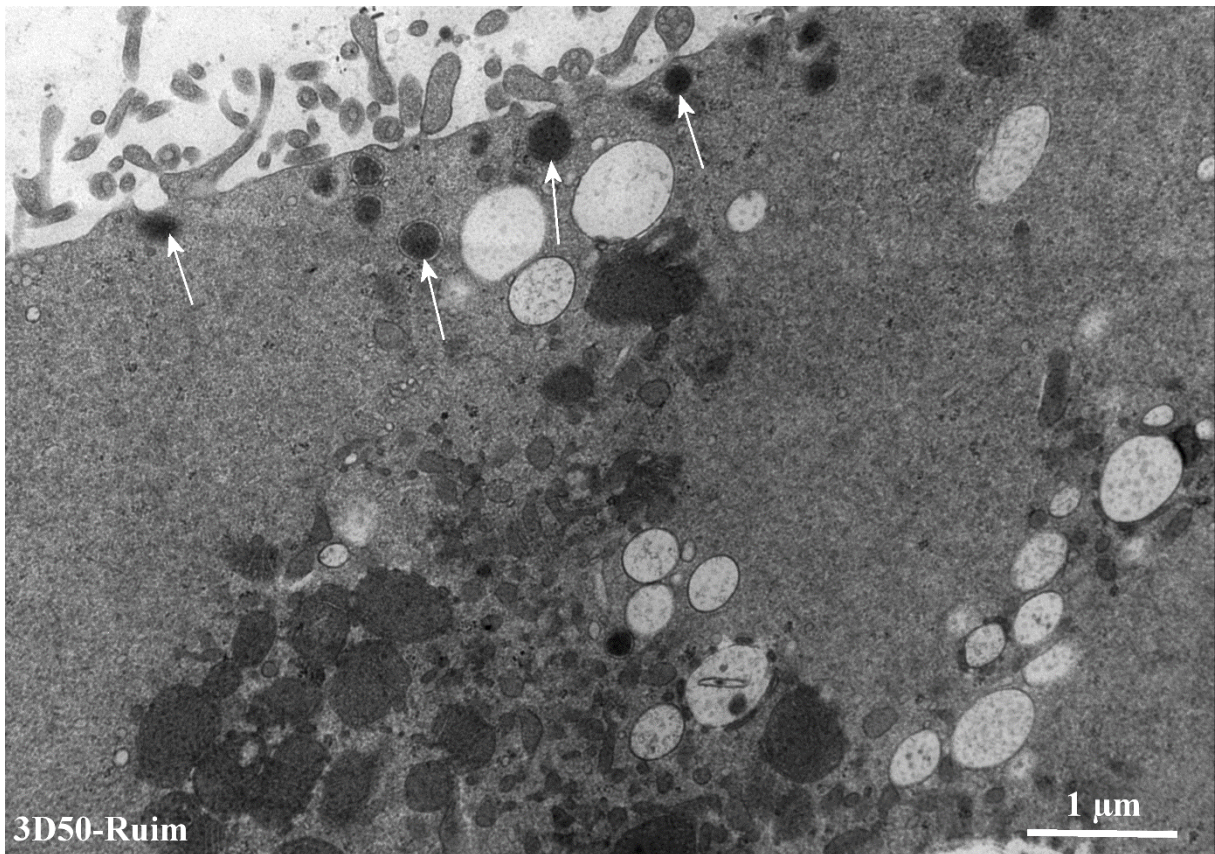


Figura 8. Eletromicrografia do citoplasma de ovócitos indicando grânulos corticais do grupo 3D50-Ruim

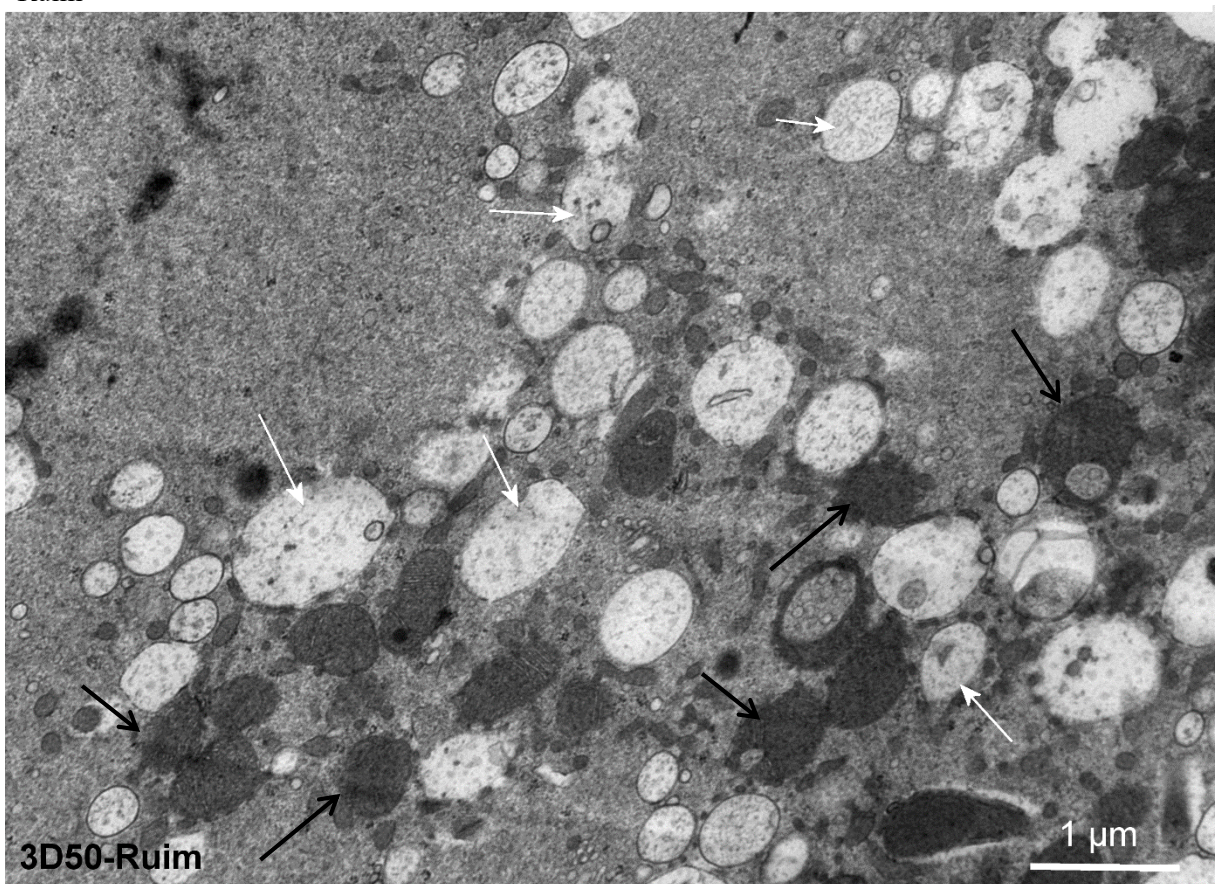


Figura 9. Eletromicrografia do citoplasma de ovócitos indicando vacúolos (setas brancas) e mitocôndrias (setas pretas) do grupo 3D50-Ruim

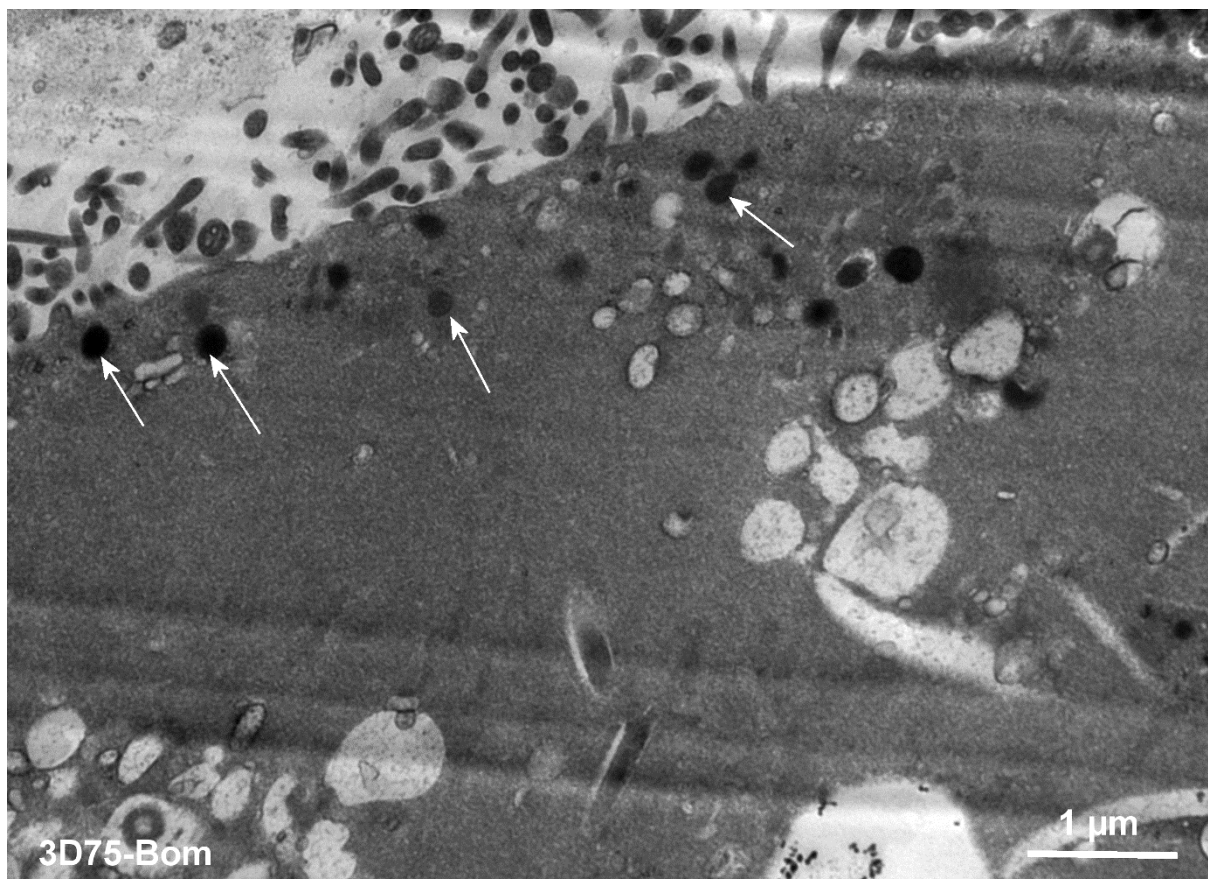


Figura 10. Eletromicrografia do citoplasma de ovócitos indicando grânulos corticais do grupo 3D75-Bom

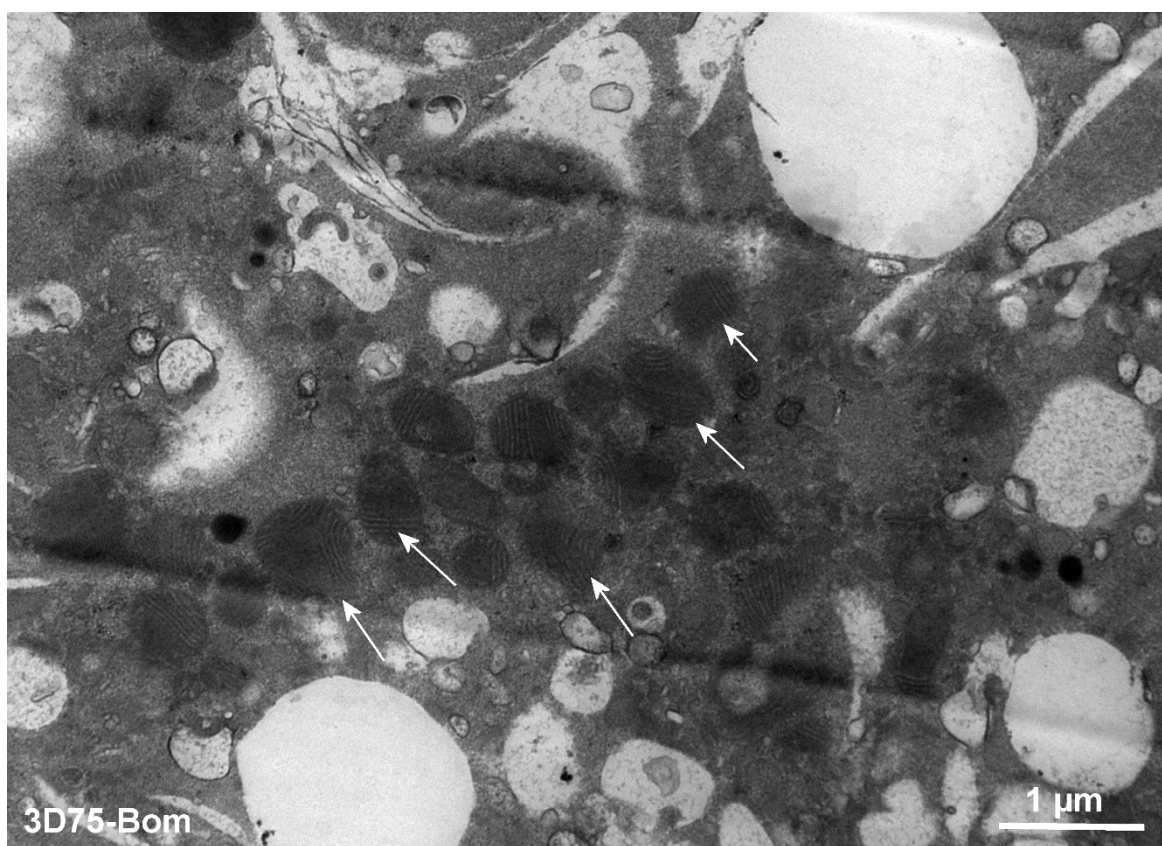


Figura 11. Eletromicrografia do citoplasma de ovócitos indicando mitocôndrias do grupo 3D75-Bom

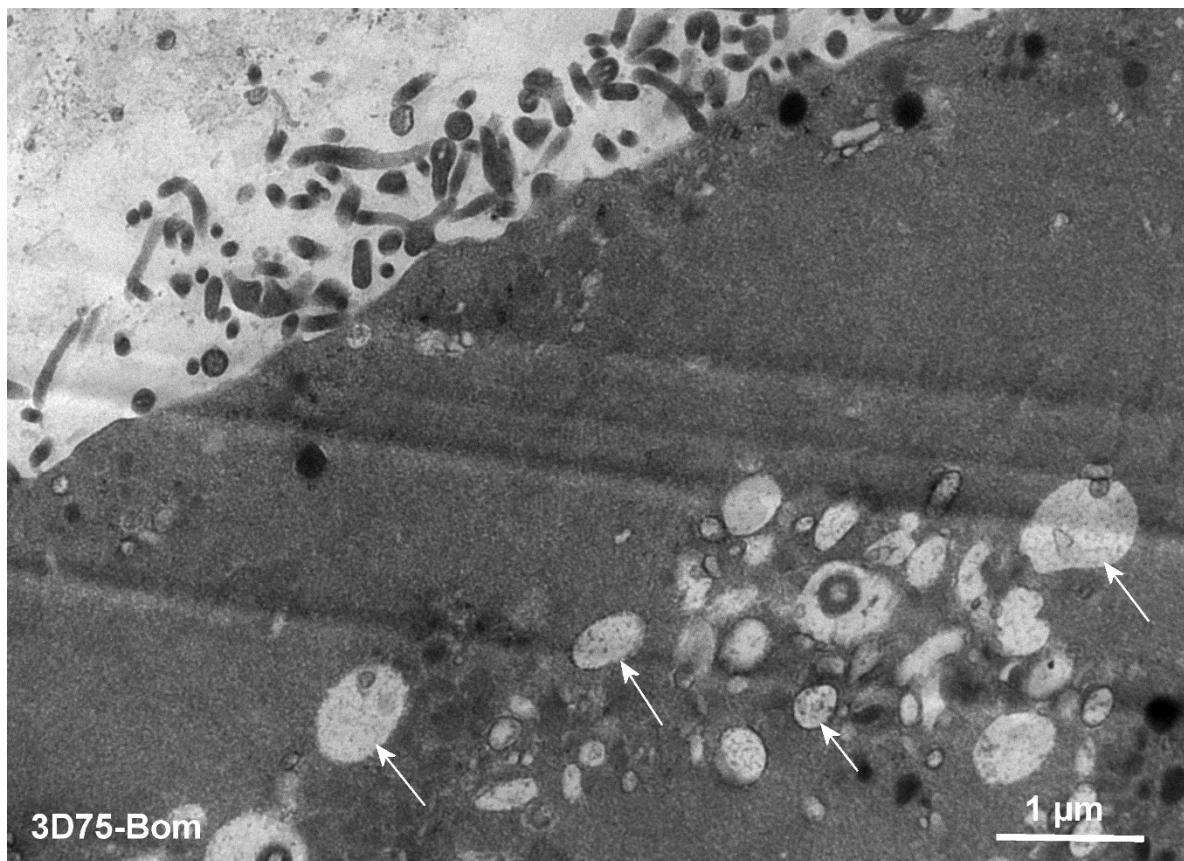


Figura 12. Eletromicrografia do citoplasma de ovócitos indicando vacúolos do grupo 3D75-Bom

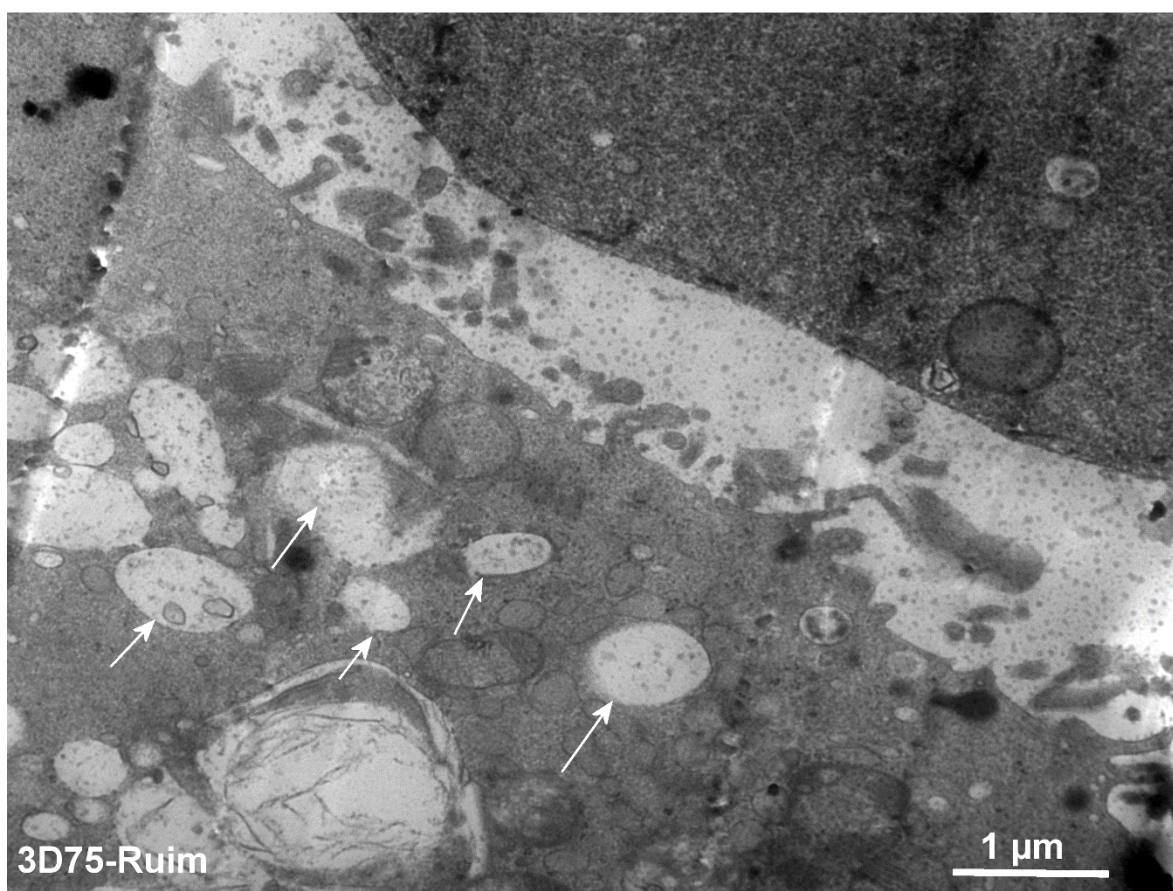


Figura 13. Eletromicrografia do citoplasma de ovócitos indicando vacúolos do grupo 3D75-Ruim

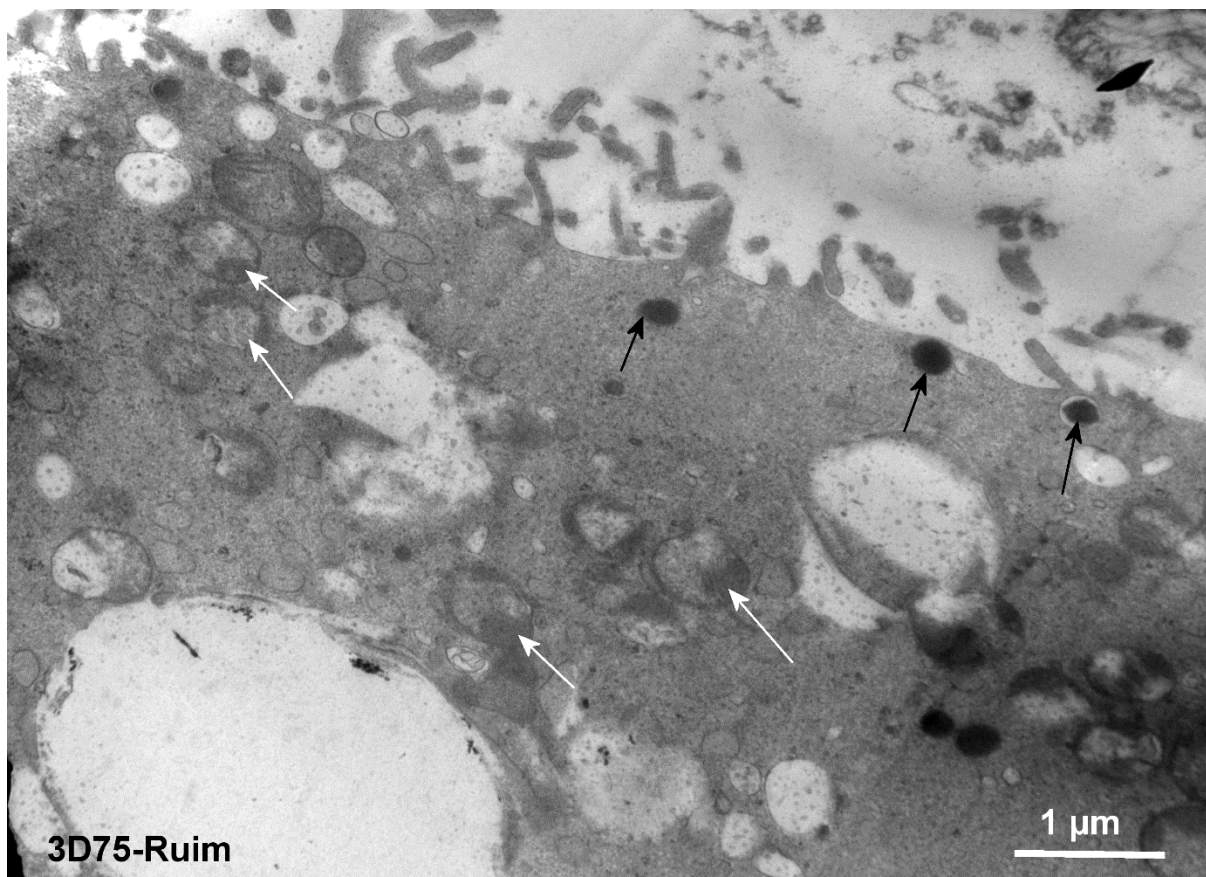


Figura 14. Eletromicrografia do citoplasma de ovócitos indicando grânulos corticais (setas pretas) e mitocôndrias (setas brancas) do grupo 3D75-Ruim

#### 4 DISCUSSÃO

Este estudo foi o primeiro a testar o sistema de cultivo tridimensional por levitação magnética com nanopartículas formadas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos. Na área de reprodução animal houve apenas um outro trabalho realizado com a mesma técnica de cultivo, porém foi utilizado no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos (ANTONINO, D. C., 2017, no prelo).

Segundo Dumollard et. al (2007), as organelas mais estudadas para se avaliar competência e maturação celular, são as mitocôndrias, pois, de acordo com o nível da maturação, vários aspectos mitocondriais são alterados, dentre eles, a quantidade de mitocôndrias encontrada na célula, sendo que quanto mais competentes e maduros, maior a quantidade de mitocôndrias (Reader, et. al, 2015). A quantidade e distribuição dessas organelas é importante devido sua função energética, ou seja, produção de ATP. Portanto a competência do ovócito está diretamente relacionada à quantidade e distribuição das mitocôndrias (Van Blerkom 2009; Zeng et al. 2009). Diante disso, é possível justificar a melhor taxa de clivagem

dos grupos 2D-Bom e 3D50-Bom, pois são os grupos com maior quantidade de mitocôndrias. Segundo Hyttel et al. (1986), um ovócito maduro apresenta distribuição homogênea das mitocôndrias. A partir disso é possível explicar a alta taxa de formação de blastocistos no grupo 3D75-Bom mesmo com menor área ocupada por mitocôndrias, pois estas estão localizadas mais ao centro do citoplasma, próximas ao núcleo onde há alta demanda energética, ao contrário do grupo 3D50-Bom no qual as mitocôndrias, embora ocupem área maior, estão concentradas na periferia do ovócito.

De acordo com Pascale et. al (2005), as mitocôndrias não se multiplicam durante a clivagem, apenas durante o crescimento do ovócito, ou seja, durante sua maturação. Neste trabalho notou-se que houve decréscimo na quantidade de mitocôndrias nos grupos de ovócitos maturados com nanopartículas em relação ao grupo controle e, também foi possível notar que os grupos com 75 µL/mL de nanopartículas foram os grupos com menor quantidade de mitocôndrias. Assim, pode-se dizer que a presença das nanopartículas foram prejudiciais durante a maturação ovocitária, pois influenciou, negativamente, na replicação mitocondrial.

No presente trabalho, os grupos, 2D-Ruim, 3D75-Bom e 3D75-Ruim, apresentaram maior área ocupada por vacúolos. Os demais grupos, 2D-Bom, 3D50-Bom e 3D50-Ruim, apresentaram menor área ocupada por essas estruturas. A análise de imagem demonstrou que a quantidade de vacúolos aumenta quando a quantidade de mitocôndrias diminui, e, de acordo com a análise visual ultraestrutural, no grupo controle os vacúolos são encontrados em associação com as mitocôndrias. Esta observação nos leva a pensar na possibilidade de ter ocorrido eventos de autofagia, sendo que parte dos vacúolos seriam resultantes deste processo. Assim também seria justificada a diminuição das mitocôndrias. A autofagia ocorre quando os autofagossomos capturam componentes do citoplasma celular e encaminham aos lisossomos que são encarregados de realizar a degradação destes componentes, portanto, a autofagia está diretamente relacionada com a morte celular (Lin et al, 2018). Este processo foi observado em um trabalho desenvolvido por Escobar Sánchez et al (2012), onde viram que os ovócitos de ratos apresentavam, simultaneamente, as proteínas envolvidas tanto no processo de apoptose quanto no processo de autofagia.

Estruturas muito semelhantes aos vacúolos encontrados nos ovócitos bovinos usados neste trabalho, foram descritas em outros trabalhos utilizando ovócitos de outras espécies incluindo humanos (Sá, R., et al., 2011), gambás (Falconnier e Kress, 1992), ovelhas (Cran, et al., 1980), porcos (Cran, D. G., 1985) e ratos (Ducibella, et al., 1988). As estruturas são descritas como grandes vesículas, translúcidas e de membrana distorcida ou interrompida, como foi revisado por Reader, K.L (2017) que podem conter em seu interior substâncias como  $Ca^{+}$  e

lipídeos (Maximo D.M., et. al., 2012), sugerindo que estas vesículas podem ser de grande importância na maturação ovocitária e, conseqüentemente no desenvolvimento do embrião. No entanto, no presente trabalho o aumento destas estruturas foi acompanhado pela queda no desenvolvimento embrionário. Isso corrobora ainda mais com a hipótese de autofagia das mitocôndrias.

O sucesso na fertilização está diretamente relacionado à presença dos grânulos corticais, pois eles desempenham um papel muito importante no mecanismo de defesa do ovócito contra a poliespermia (Liu M., 2011) e sua distribuição no citoplasma do ovócito é um indicador da maturação ovocitária (Damiani P, 1996). Neste trabalho o grupo 3D75-Bom apresentou ovócitos com maior área ocupada por grânulos, os quais estão próximos à membrana plasmática, indicando uma boa maturação, pois segundo Halay e Wessel (2004), após a maturação do ovócito, os grânulos saem do centro do citoplasma e se alinham à membrana. O grupo controle 2D-Bom também se destaca na área ocupada e na distribuição dos grânulos, sendo que juntamente com o grupo 3D75-Bom, apresentaram as maiores taxas de blastocistos formados. Já os grupos com a menor taxa de blastocistos, também apresentaram ovócitos com a menor área ocupada por grânulos, que foram os grupos 3D50-Bom e 3D75-Ruim. Nestes grupos também foi observado a formação de clusters pelos grânulos, indicando que a maturação não foi completa (Hosoe e Shioya, 1997; Wessel et al., 2001).

Estudos realizados anteriormente revelam que os microvilos dos ovócitos apresentam a proteína CD9, proteína esta que é necessária na fusão entre o espermatozoide e a membrana do ovócito (Kaji et al., 2000). Outro estudo utilizando imagens geradas a partir da microscopia eletrônica de transmissão mostra que o espermatozoide é envolvido pelos microvilos e, assim, consegue se fundir à membrana do ovócito (Shalgi and Phillips, 1980). No presente estudo, os grupos que, visualmente, apresentaram maior quantidade de microvilos foram o 2D-Bom e 3D75-Bom, os mesmos que se destacaram na taxa de clivagem e de blastocistos. Em concordância, nos demais grupos, que apresentaram as menores taxas de blastocistos, a quantidade de microvilos que, aparentemente, apresentam, é notavelmente menor em relação aos grupos destaque.

Em relação aos artefatos encontrados, acreditamos que sejam provenientes de erros técnicos no momento do corte das amostras, pois nenhum trabalho relata a presença de tais estruturas.

A partir das análises estatísticas e citológicas realizadas neste trabalho, percebe-se que o uso de nanopartículas na maturação ovocitária não é vantajoso. Ficou comprovado que as nanopartículas não atrapalham a fecundação do ovócito, visto que as taxas de clivagem do grupo



com maior concentração de nanopartículas (3D75-Ruim) foram maiores em relação ao grupo controle 2D-Ruim (ambos os grupos utilizando ovócitos ruins), porém as nanopartículas interferem na maturação ovocitária, visto que com o aumento da concentração das nanopartículas, houve aumento da área ocupada por vacúolos e redução, considerável, da área ocupada por mitocôndrias. Portanto, o sistema utilizado interfere no desenvolvimento embrionário, visto que as taxas de formação de blastocistos apresentam queda significativa nos grupos com o aumento da concentração das nanopartículas.

## 5 CONCLUSÃO

Apesar de não interferir no processo de fecundação do ovócito, conclui-se que o sistema de cultivo utilizado na maturação ovocitária não é vantajoso, pois causam aumento da área ocupada por vacúolos e redução, considerável, da área ocupada por mitocôndrias e, conseqüentemente, interferem no desenvolvimento embrionário.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONINO, D. C. Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos associado à nanopartículas e levitação magnética. Universidade Federal de Uberlândia, campus Uberlândia, 2017. No prelo.

ARAÚJO, V. R.; GASTAL, M. O.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, p. 78, 2014.

BAERWALD, A. D. Human antral folliculogenesis: what we have learned from the bovine and equine models. **Animal Reproduction**, v. 6, n. 1, p. 20-29, 2009.

BELETTI, M. E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n.2, p.92-96, 2013.

BOZZOLA, J. J.; RUSSEL, L. D. Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists. 2nd ed. p. 670. Sudbury: Jones and Barlett Learnig, 1998.

BREVINI, T. A. L.; FRANCISCI, R. V. C.; GANDOLFI, F. Role of Adenosine Triphosphate, Active Mitochondria, and Microtubules in the Acquisition of Developmental Competence of Parthenogenetically Activated Pig Oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 72, p. 1218–1223, 2005.

CHOI, M. H; LEE, S. H; KIM, H. O; et al. Comparison of assisted reproductive technology outcomes in infertile women with polycystic ovary syndrome: *in vitro* maturation, GnRH agonist, and GnRH antagonist cycles. **Clin Exp Reprod Med**. v. 39; p. 166–171, 2012.

COTICCHIO G, DAL CANTO M, MIGNINI RENZINI M, GUGLIELMO, M. C, BRAMBILLASCA, F.; TURCHI, D.; NOVARA, P. V.; FADINI, R. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. **Human Reproductive Update**. v. 21; p. 427 – 454, 2015

CRAN, D.G. Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 74, p. 237–245, 1985.

CRAN, D. G.; MOOR, R. M.; HAY, M. F. Fine structure of the sheep oocyte during antral follicle development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, n. 1, p. 125–132, 1980.

DADARWAL, D.; ADAMS, G. P.; HYTTEL, P.; BROGLIATTI, G. M.; CALDWELL, S.; SINGH, J. Organelle reorganization in bovine oocytes during dominant follicle growth and regression. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, p. 124, 2015.

DAMIANI, P.; FISSORE, R. A.; CIBELLI, J. B.; LONG, C. R.; BALISE, J. J.; ROBL, J. M.; DUBY, R. T. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, n. 4, p. 521-534, 1996.

DAQUINAG, A. C.; SOUZA, G. R.; KOLONIN, M. G. Adipose tissue engineering in three-dimensional levitation tissue culture system based on magnetic nanoparticles. **Tissue engineering. Part C, Methods**, v. 19, n. 5, p. 336–44, 2013.

DORATI, R., GENTA, I., FERRARI, M., VIGONE, G., MERICO, V., GARAGNA, S., ZUCCOTTI, M. and CONTI, B. Formulation and stability evaluation of 3D alginate beads potentially useful for cumulus–oocyte complexes culture. **Journal of microencapsulation**, v. 33, n. 2, p. 137-145, 2016.

DUCIBELLA, T.; RANGARAJAN, S.; ANDERSON, E. The development of mouse oocyte cortical reaction competence is accompanied by major changes in cortical vesicles and not cortical granule depth. **Development of Biology**, v. 130, p. 789–792, 1988.

DUMOLLARD, R.; DUCHEN, M.; CARROLL, J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 77; p. 21–49, 2007.

DUMOLLARD, R.; DUCHEN, M.; SARDET, C. Calcium signals and mitochondria at fertilization. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 17, p. 314-323, 2006.

ESCOBAR-SÁNCHEZ, M. L., ECHEVERRÍA-MARTÍNEZ, O. M. & VÁZQUEZ-NIN, G. H. Immunohistochemical and ultrastructural visualization of different routes of oocyte limination in adult rats. *European Journal of Histochemistry*, v. 56, n. 2, p. 17, 2012.

FALCONNIER, C.; KRESS, A. Ultrastructural aspects of oocyte growth in the marsupial *Monodelphis domestica* (grey short-tailed opossum). **Journal of Anatomy**, v. 181, n. Pt 3, p. 481–498, 1992

FRANSOLET, M.; LABIED, S.; HENRY, L.; MASEREEL, M.C.; ROZET, E.; KIRSCHVINK, N.; NISOLLE, M., and MUNAUT, C. Strategies for using the sheep ovarian cortex as a model in reproductive medicine. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–7, 2014.

GREEN, L. J.; SHIKANOV, A. *In vitro* culture methods of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 229–238, 2016.

HALEY, S. A.; WESSEL, G. M. Regulated proteolysis by cortical granule serine protease 1 at fertilization. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, p. 2084-2092, 2004.

HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote**, v. 5, p. 371-376, 1997.

HYTTEL, P., XU, K. P., SMITH, S., and GREVE, T. Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, n. 2, p. 615–625, 1986.

ImageJ 1.51j8, **National Institutes of Health**, USA.

KAJI, K.; ODA, S., SHIKANO, T., OHNUKI T., UEMATSU Y., SAKAGAMI J., TADA, N., MIYAZAKI, S., KUDO, A. The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. **Nature Genetics**, v. 24, n. 3, p. 279–282, 2000.

KURODA, K.; KITADE, M.; KIKUCHI, I.; KUMAKIRI, J.; MATSUOKA, S.; KURODA, M. and TAKEDA, S. The impact of endometriosis, endometrioma and ovarian cystectomy on assisted reproductive technology. **Reproductive medicine and biology**, v. 8, n. 3, p. 113-118, 2009.

LIN, FEI-HU, WEI-LING ZHANG, HONG LI, XIAO-DAN TIAN, JIE ZHANG, XIAO LI, CHUAN-YONG LI, and JING-HE TAN. Role of autophagy in modulating post-maturation aging of mouse oocytes. **Cell death & disease**, v. 9, n. 3, p. 308, 2018.

LIN, H. et al. Nanoparticle Improved Stem Cell Therapy for Erectile Dysfunction in a Rat Model of Cavernous Nerve Injury. **The Journal of urology**, v. 195, n. 3, p. 788–795, 2016.

LIU, M. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, n. 1, p.149, 2011.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M. P. Oocytes and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction of Domestic Animal**, v. 38, n. 1782, p. 259-267, 2003.

MAO, L.; LOU, H.; LOU, Y.; WANG, N.; JIN, F. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. **Reproductive BioMedicine Online**.v.28, p.284-299, 2014.

MÁXIMO, D. M.; DA SILVA, I. M.; MONDADORI, R. G.; NEVES, J. P. and LUCCI, C. M. Ultrastructural characteristics of sheep oocytes during in vitro maturation (IVM). **Small ruminant research**, v. 105, n. 1, p. 210-215, 2012.

MAY-PANLOUP, P., VIGNON, X., CHRÉTIEN, M.F., HEYMAN, Y., TAMASSIA, M., MALTHIÈRY, Y. and REYNIER, P. Increase of mitochondrial DNA content and transcripts in early bovine embryogenesis associated with upregulation of mtTFA and NRF1 transcription factors. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, n. 1, p. 65, 2005.

MINGOTI, G. Z.; GARCIA, J. M.; ROSA E SILVA, A. A. M.. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids.. **Animal Reproduction Science**, v.69, p.175-186, 2002.

MOLINA, J. R.; HAYASHI, Y; STEPHENS, C.; GEORGESCU, M. Invasive glioblastoma cells acquire stemness and increased Akt activation. **Neoplasia**, v. 12, p. 453, 2010.

READER, K. L., STANTON, J. A. L. and JUENGEL, J. L. The Role of Oocyte Organelles in Determining Developmental Competence. **Biology**, v. 6, n. 3, p.35, 2017.

READER, K. L.; COX, N. R.; STANTON, J. A. L.; JUENGEL, J. L. Mitochondria and vesicles differ between adult and prepubertal sheep oocytes during IVM. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27; p. 513–522, 2015.

ROSENDAHL, M.; ANDERSEN, C. Y.; FREIESLEBEN, N. C.; JUUL, A.; LOSSL, K. and ANDERSEN, A. N. Dynamics and mechanisms of chemotherapy-induced ovarian follicular depletion in women of fertile age. **Fertility and Sterility**, v.94, n.1, June 2010.

SÁ, R.; CUNHA, M.; SILVA, J.; LUÍS, A.; OLIVEIRA, C.; TEIXEIRA DA SILVA, J.; BARROS, A.; SOUSA, M. Ultrastructure of tubular smooth endoplasmic reticulum aggregates in human metaphase II oocytes and clinical implications. **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 1, p. 143–149, 2011.

SHALGI, R., PHILLIPS, D. M. Mechanics of in vitro fertilization in the hamster. **Biology of Reproduction**, v. 23, p. 433–444, 1980.

SHIRASAWA, H. and TERADA, Y. *In vitro* maturation of human immature oocytes for fertility preservation and research material. **Reproductive medicine and biology**, 2017.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**.v.55, p.1241-1254,2001.

SOMFAIA, T.; INABAA, Y.; WATANABEA, S.; GESHA, M.; NAGAI, T. Follicular fluid supplementation during in vitro maturation promotes sperm penetration in bovine oocytes by enhancing cumulus expansion and increasing mitochondrial activity in oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v.24, p.743–752, 2012.

SOUZA, G.; R.; MOLINA, J. R.; RAPHAEL, R. M.; OZAWA, M. G.; STARK, D. J.; LEVIN, C. S.; BRONK, L. F.; ANANTA, J. S.; MANDELIN, J.; GEORGESCU, M.; BANKSON, J. A.; GELOVANI, J. G.; KILLIAN, T. C.; ARAP, W.; PASQUALINI, R. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. **Nature Nanotechnology**, v. 5, p. 291-296, 2010.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 904-909, 2001.

TELFER, E. E.; MCLAUGHLIN, M. Strategies to support human oocyte development *in vitro*. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 56, p. 901-907, 2012.

TSENG, H.; GAGE, J. A.; RAPHAEL, R. M.; MOORE, R. H.; KILLIAN, T. C.; GRANDE-ALLEN, J.; SOUZA, G. R. Assembly of a three dimensional multitype bronchiole coculture model using magnetic levitation. **Tissue Engineering**, v. 19, n. 9, 2013.

VAN BLERKOM, J. (2009). Mitochondria in early mammalian development. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 20, n. 3, p. 354–364, 2009.

WESSEL, G. M.; BROOKS, J. M.; GREEN, E.; HALEY, S.; VORONINA, E.; WONG, J.; ZAYDFUDIM, V.; CONNER, S. The biology of cortical granules. **International ReviewCytology**, v.209, p.117-206, 2001.

WOODRUFF, T. K. Oncofertility: a grand collaboration between reproductive medicine and oncology. **Reproduction**; v. 150; n. 3; p. S1-S10, 2015

ZENG, H. T., YEUNG, W. S., CHEUNG, M. P., HO, P. C., LEE, C. K., ZHUANG, G. L., LIANG, X. Y., and O, W. S. *In vitro*-matured rat oocytes have low mitochondrial deoxyribonucleic acid and adenosine triphosphate contents and have abnormal mitochondrial redistribution. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 3, p. 900–907, 2009.