

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

LARISSA MARTINS SILVA

**PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO* ASSOCIADA À MATURAÇÃO
EM SISTEMA TRIDIMENSIONAL DE CULTIVO**

Uberlândia - MG

2018

LARISSA MARTINS SILVA

**PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO* ASSOCIADA À MATURAÇÃO
EM SISTEMA TRIDIMENSIONAL DE CULTIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de Médica Veterinária, apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora: Professora Doutora Ricarda Maria dos Santos

Coorientadora: Doutora Kele Amaral Alves

Uberlândia - MG

2018

LARISSA MARTINS SILVA

**PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO* ASSOCIADA À MATURAÇÃO
EM SISTEMA TRIDIMENSIONAL DE CULTIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela banca examinadora,
como requisito parcial à obtenção do grau de Médica Veterinária,
apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de
Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Uberlândia, 29 de Junho de 2018 às 09 horas e 30 minutos.

Banca Examinadora

Professora Doutora Ricarda Maria dos Santos
Orientadora (FAMEV – UFU)

Professor Doutor José Octávio Jacomini
Examinador (FAMEV –UFU)

Mayara Mafra Soares
Examinadora (Doutoranda – FAMEV – UFU)

Uberlândia - MG

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou meu caminho durante esta caminhada.

À minha família e amigos por acreditarem e investirem em mim. Em especial à minha mãe, meu pai, minha avó, minha madrinha e minha irmã pelo carinho, apoio, cuidado e dedicação que em alguns momentos, foi o que me deu esperanças para seguir em frente.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, seu corpo docente, direção, administração e coordenação de curso, pela oportunidade e ensinamentos que foram tão importantes na minha vida acadêmica e pessoal, assim como serão na minha vida profissional.

A todos os professores da disciplina de Reprodução Animal da UFU, pelos ensinamentos; à minha orientadora, professora doutora Ricarda Maria dos Santos, à minha coorientadora doutora Kele Amaral Alves, ao professor doutor Marcelo Beletti e ao doutor Bênnner Geraldo Alves por me aceitarem tão bem, pelo suporte, ensinamentos, apoio e correções que foram de extrema importância para o desenvolvimento do trabalho e para concretizar a etapa final de um sonho.

Às parceiras de laboratório Luisa, Luana, Amanda, Mayara, Gracie e Deize pelo auxílio, pelos ensinamentos e pela paciência.

Ao laboratório de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia, que possibilitou o desenvolver deste trabalho.

A todos os integrantes dos grupos PET Medicina Veterinária e UFU Corte que me acompanharam na trajetória acadêmica, em especial ao tutor do grupo PET, professor doutor Marcus Vinicius Coutinho Cossi e ao tutor do grupo UFU Corte, professor doutor Felipe Antunes Magalhães, pelos conselhos, ensinamentos, paciência e orientação, os quais contribuíram para a minha formação pessoal e profissional, meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é o procedimento mais utilizado quando se busca o incremento produtivo de rebanhos bovinos. A técnica consiste em três etapas consecutivas de realização, precedidas pela obtenção dos ovócitos: a maturação *in vitro* de ovócitos (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* de embriões (CIV). Para superar possíveis desvantagens do sistema de cultivo bidimensional (2D) empregado na maturação dos ovócitos, foi desenvolvido um sistema de cultivo tridimensional (3D) que mimetiza o ambiente natural de desenvolvimento das células. O estudo foi realizado no laboratório de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia e teve como objetivo utilizar o sistema 3D composto por nanopartículas e levitação magnética, durante a maturação de ovócitos bovinos bons e ruins, testando duas concentrações de nanopartículas e comparando as taxas de clivagem e taxas de blastocistos obtidas neste sistema com as obtidas no sistema 2D. Os ovócitos bovinos foram obtidos de ovários provenientes de abatedouro e classificados quanto à qualidade em ovócitos bons e ruins; maturados em sistema de cultivo tridimensional composto por nanopartículas magnéticas constituídas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina, nas concentrações de 50 μ L/mL ou 75 μ L/mL, associadas à levitação magnética; fertilizados e os prováveis embriões foram cultivados *in vitro* por 7 dias. Após 48 horas da FIV, a taxa de clivagem foi avaliada e, após o cultivo *in vitro* dos embriões, a taxa de blastocistos formados, ambas por análise de porcentagem. Com auxílio do programa SigmaPlot versão 11, foram aplicados o teste de qui-quadrado e o teste de razão das chances. Após avaliar as taxas de clivagem, o grupo de ovócitos ruins maturados com a concentração de 75 μ L/mL no sistema 3D apresentou 1,6 vezes mais chances de clivar do que ovócitos ruins maturados no sistema 2D; mostrando taxas de clivagem semelhantes aos grupos de ovócitos bons maturados tanto no sistema 2D quanto no 3D com a concentração de 50 μ L/mL. Com relação às taxas de blastocistos, os grupos de ovócitos ruins e ovócitos bons maturados com a concentração de 75 μ L/mL no sistema 3D tiveram taxas semelhantes às do grupo de ovócitos bons maturados no sistema 2D. Concluiu-se que o sistema de cultivo 3D, quando utilizado na concentração de 75 μ L/mL de nanopartículas, viabilizou ovócitos ruins, gerando taxas de produção semelhantes às dos grupos de ovócitos bons maturados em ambos os sistemas de cultivo.

Palavras-chave: Biotecnologia. Blastocistos. Clivagem. Nanopartículas. Reprodução Animal.

ABSTRACT

The in vitro production of embryos (PIVE) is the most used procedure when searching the productive increase of bovine herds. The technique consists of three consecutive steps, preceded by oocytes: in vitro maturation of oocytes (IVM), in vitro fertilization (IVF) and in vitro embryo culture (IVC). To overcome possible disadvantages of the two-dimensional (2D) culture system used in oocyte maturation, a three-dimensional (3D) culture system was developed that mimics the natural environment of cell development. The study was carried out at the Reproduction Biology Laboratory of the Federal University of Uberlândia and the objective of this study was to use the 3D system composed of nanoparticles and magnetic levitation, during the maturation of good and bad bovine oocytes, testing two concentrations of nanoparticles and comparing the rates of cleavage and blastocyst rates obtained in this system with those obtained in the 2D system. The bovine oocytes were obtained from ovaries from slaughterhouse and classified for quality in good and bad oocytes; matured in a three-dimensional culture system composed of magnetic nanoparticles composed of gold, iron oxide and poly-L-lysine, at concentrations of 50 $\mu\text{L} / \text{mL}$ or 75 $\mu\text{L} / \text{mL}$, associated with magnetic levitation; fertilized and the probable embryos were cultured in vitro for 7 days. After 48 hours of IVF, the rate of cleavage was evaluated and, after in vitro culture of the embryos, the rate of blastocysts formed, both by percentage analysis. Using the Sigma Plot version 11 program, the chi-square test and the odds ratio test were applied. After evaluating the cleavage rates, the group of poor oocytes matured with the concentration of 75 $\mu\text{L} / \text{mL}$ in the 3D system presented 1.6 times more chances of cleaving than poor oocytes matured in the 2D system; showing similar cleavage rates to groups of good oocytes matured in both the 2D and 3D systems at 50 $\mu\text{L} / \text{mL}$. Regarding the blastocyst rates, the groups of bad oocytes and good oocytes matured at the concentration of 75 $\mu\text{L} / \text{mL}$ in the 3D system had similar rates to that of the group of good oocytes matured in the 2D system. It was concluded that the 3D culture system, when used in the concentration of 75 $\mu\text{L} / \text{mL}$ of nanoparticles, allowed bad oocytes, generating production rates similar to those of the good oocyte groups matured in both culture systems.

Keywords: Biotechnology. Blastocysts. Cleavage. Nanoparticles. Animal Reproduction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Classificação de ovócitos. A (Grau I), B (Grau II), C (Grau III) e D (Grau IV).
Fonte: Stringfellow e Givens, 2010.....15
- Figura 2** Ovócitos imaturos com o *cumulus* compacto (A) e maturados com o *cumulus* expandido (B). Fonte: Gonçalves, Figueiredo e Freitas, 2008.....17
- Figura 3** Esquema dos grupos experimentais utilizados na pesquisa. Fonte: Pessoal.....22
- Figura 4** Retirada de ovócitos do microtubo para a transferência para a placa de 24 poços.
Fonte: Pessoal.....23
- Figura 5** Transferência de ovócitos para a placa de 24 poços. Fonte: Pessoal.....23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Taxas de clivagem e de produção de blastocistos de ovócitos bovinos maturados nos sistemas de cultivo 2D e 3D.....	27
Tabela 2	Teste de razão das chances para taxas de clivagem de ovócitos classificados como bons, maturados nos sistemas de cultivo 2D e 3D.....	28
Tabela 3	Teste de razão das chances para taxas de clivagem de ovócitos classificados como ruins, maturados nos sistemas de cultivo 2D e 3D.....	29
Tabela 4	Teste de razão das chances de clivagem de ovócitos maturados no mesmo sistema de cultivo, comparando as diferentes classificações (bons e ruins).....	29
Tabela 5	Teste de razão das chances para taxas de clivagem comparando ovócitos classificados como bons e ruins e os diferentes sistemas de maturação ovocitária.....	30
Tabela 6	Análise de razão das chances para produção de blastocistos de ovócitos classificados como bons, maturados nos sistemas de cultivo 2D e 3D.....	31
Tabela 7	Teste de razão das chances para taxas de blastocistos de ovócitos classificados como ruins, maturados nos sistemas de cultivo 2D e 3D.....	31
Tabela 8	Teste de razão das chances de blastocistos de ovócitos maturados no mesmo sistema de cultivo, comparando as diferentes classificações (bons e ruins).....	32
Tabela 9	Teste de razão das chances para taxas de blastocistos comparando ovócitos classificados como bons e ruins e os diferentes sistemas de maturação ovocitária.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Sistema de Cultivo Bidimensional
3D	Sistema de Cultivo Tridimensional
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina Sérica Bovina
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
COC's	Complexos <i>cumulus</i> -ovócito
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
LH	Hormônio Luteinizante
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
PHE	Penicilina-Hipotaurina-Epinefrina
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
RPM	Rotações por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	Fluido Sintético de Oviduto
TCM 199	<i>tissueculture médium</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	Microlitro
CO_2	Dióxido de Carbono
O_2	Oxigênio
μg	Microgramas
mg	Miligrama
mL	Mililitro
μM	Micrômetro
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões	14
2.1.1 Obtenção de ovócitos	14
2.1.2 Classificação de ovócitos	15
2.1.3 Maturação <i>in vitro</i> de ovócitos.....	15
2.1.4 Fertilização <i>in vitro</i>	17
2.2 Cultivo e Desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	19
2.3 Sistemas de cultivo:bidimensional e tridimensional.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Local de Desenvolvimento	21
3.2 Obtenção e Seleção de Ovócitos.....	21
3.3 Maturação <i>in vitro</i> de ovócitos	21
3.4 Fertilização <i>in vitro</i>	23
3.5 Cultivo <i>in vitro</i> de embriões	24
3.6 Análise das taxas de produção	24
3.7 Estatística	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5 CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que a eficiência reprodutiva é um dos aspectos mais relevantes da atividade pecuária, por estar diretamente relacionada à produtividade do rebanho. A crescente necessidade de incremento produtivo na pecuária leva ao desenvolvimento de várias biotécnicas, principalmente em relação à espécie bovina, que tem um baixo número de descendentes e um período longo de gestação. A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica utilizada para acelerar a reprodução de animais geneticamente superiores, que consiste em três etapas consecutivas de realização, precedidas pela obtenção de ovócitos: a maturação *in vitro* de ovócitos (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* de embriões (CIV) (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

A utilização comercial da PIVE se tornou viável após o aperfeiçoamento da aspiração folicular *in vivo* e das técnicas de cultivo embrionário *in vitro* (PONTES et al., 2011). No ano de 2015, o Brasil já era responsável por cerca de 67% do total mundial de embriões bovinos produzidos *in vitro*, de acordo com dados do relatório da Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões. Apesar de apresentar vantagens, como a possibilidade de se utilizar animais não utilizados na reprodução, como bezerras pré-púberes, vacas em início de gestação, senis ou mortas acidentalmente; a biotécnica ainda não está completamente elucidada, estando limitada pelo seu baixo rendimento e pelas baixas taxas de gestação após inovulação, uma vez que apenas 30% dos ovócitos colocados para maturar se desenvolvem até o estágio de blastocisto (PALHANO, 2008).

A fim de melhorar os aspectos produtivos da PIVE, novas técnicas que visam reproduzir o sistema natural de desenvolvimento embrionário têm sido desenvolvidas. Visto que a morfologia natural da estrutura ovocitária é tridimensional, pode-se dizer que o sistema de cultivo bidimensional (2D) apresenta desvantagens, já que os ovócitos podem ficar aderidos à placa de cultivo, prejudicando o desenvolvimento dos mesmos, impedindo o contato com os nutrientes do meio e, conseqüentemente, modificando sua estrutura. Assim, o sistema de cultivo que mantém a estrutura ovocitária tridimensional pode apresentar vantagens perante o tradicional. Um novo sistema de cultivo tridimensional (3D) constituído de nanopartículas magnéticas formadas por ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina associadas à levitação magnética, tem sido analisado como intuito de mimetizar o ambiente natural das células, recriando suas funções nativas (TSENG et al., 2013).

O método de levitação magnética por nanopartículas apresenta benefícios como a não toxicidade, a capacidade de não afetar a proliferação celular e não induzir resposta inflamatória, além de apresentar trabalhos com efeitos positivos na síntese proteica. Desta forma, é possível que este sistema contribua no processo de maturação ovocitária aumentando as taxas de clivagem e de produção de blastocistos (SOUZA et al., 2010).

O presente estudo teve como objetivo utilizar o sistema 3D composto por nanopartículas constituídas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina, associadas à levitação magnética, durante a maturação de ovócitos bovinos bons e ruins, testando as concentrações de 50 μ L/mL e 75 μ L/mL de nanopartículas, comparando as taxas de clivagem e taxas de blastocistos obtidas neste sistema com as obtidas no sistema 2D.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção *in vitro* de embriões

Segundo Gonçalves, Figueiredo e Freitas (2008) no Brasil, a partir de 1990, a técnica de PIVE tem sido muito difundida e utilizada por apresentar algumas vantagens, como possibilitar o estudo e desenvolvimento de outras biotécnicas reprodutivas a partir da micromanipulação de gametas e embriões. Nos bovinos, a inconsistência de resultados referentes às taxas de produção de mórulas e blastocistos e o custo inicial com a infraestrutura necessária tem sido algumas das limitações da biotécnica. Diante de tais limitações, alguns estudos avaliando as etapas envolvidas no processo da PIVE tem sido realizados, a fim de analisar as variáveis envolvidas. A PIVE é precedida pela obtenção dos ovócitos, seguida por um processo formado por três etapas: a maturação *in vitro* de ovócitos, a fertilização *in vitro* e o cultivo *in vitro* de embriões.

2.1.1 Obtenção de ovócitos

Os ovócitos utilizados em procedimentos de PIVE podem ser obtidos a partir de ovários provenientes de abatedouros, por punção folicular com agulha acoplada a uma seringa ou bomba de vácuo ou por dissecação folicular, ou ainda *in vivo* por ultrassonografia via transvaginal com aspiração por uma agulha acoplada a uma bomba de vácuo. Após a aspiração, com o auxílio de estereoscópio, faz-se o rastreamento e seleção dos ovócitos, levando em consideração o número de camadas de células do *cumulus* e o aspecto do citoplasma da célula (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

O transporte de ovários provenientes de abatedouros, para que não se afete a viabilidade dos mesmos, deve ser feito em garrafa térmica, numa temperatura de 35°C a 38°C, não excedendo 4 horas da coleta dos ovários até a manipulação em laboratório. Os ovócitos utilizados na PIVE são geralmente obtidos de folículos com diâmetro entre 2 e 8 milímetros. Isso se deve ao fato de que ovócitos presentes em folículos menores que 2 milímetros de diâmetro não são competentes para reiniciar a meiose e os ovócitos aspirados de folículos maiores que 8 milímetros já estão em processo de atresia ou em processo de maturação, o que compromete sua viabilidade em ambos os casos (PALHANO, 2008).

2.1.2 Classificação de ovócitos

Várias classificações morfológicas dos complexos *cumulus*-ovócito (COC's) tem sido adotadas. A mais conhecida é a citada por Stringfellow e Givens (2010), a qual considera as características do *cumulus* (cobertura do ovócito) e do citoplasma (ovoplasma). Tais autores classificam os ovócitos bons em grau I, no qual o *cumulus* está compacto, presente, contendo mais de três camadas de células, ovoplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida (Figura 1-A); e grau II, cujo *cumulus* é compacto, parcialmente presente em volta do ovócito ou o rodeando completamente, com menos de três camadas celulares, ovoplasma com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura (Figura 1-B).

Segundo os mesmos autores, os ovócitos ainda são considerados em ruins, distribuídos na classificação em grau III, na qual o *cumulus* está presente, mas expandido, ovoplasma contraído com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelínico (Figura 1-C); e grau IV onde os ovócitos estão desnudos sem células do *cumulus*, possuem citoplasma de cor e granulação anormais ou com células expandidas com aspecto apoptótico (Figura 1-D).

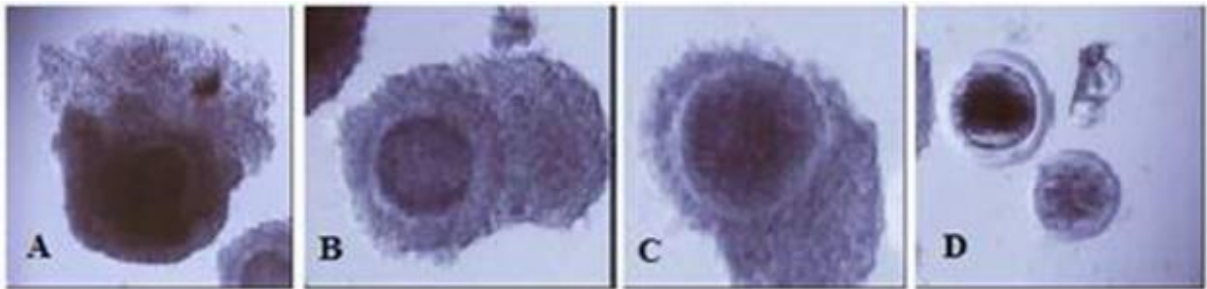


Figura 1. Classificação de ovócitos. A (Grau I), B (Grau II), C (Grau III) e D (Grau IV). Fonte: Stringfellow e Givens, 2010.

2.1.3 Maturação *in vitro* de ovócitos

A maturação ovocitária consiste em uma série de alterações nucleares, moleculares e citoplasmáticas, que irão preparar o ovócito para a próxima etapa que é a fecundação (GOTTARDI; MINGOTI, 2009). Dentro do processo da PIVE, a MIV compreende uma das etapas mais críticas, já que é nessa fase que o ovócito adquire capacidade para ser fecundado e então sustentar os estágios subsequentes de

desenvolvimento. Desta forma, condições ideais empregadas nesta etapa irão determinar o sucesso na etapa de FIV e o subsequente desenvolvimento embrionário (SOMFAI et al., 2011).

Segundo Gonçalves, Figueiredo e Freitas (2008), a maturação do núcleo do ovócito na espécie bovina compreende a progressão do estágio de diplóteno da primeira prófase meiótica até o estágio da fase de metáfase II, ocorrendo durante esta progressão, a quebra da vesícula germinativa, condensação dos cromossomos, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico. Concomitante à maturação do núcleo, o ovócito sofre alterações citoplasmáticas que contribuem para sua maturação.

A maturação citoplasmática é um processo complexo, envolvendo várias modificações que incluem a modulação da síntese de proteínas e reorganização de organelas citoplasmáticas, como redução do tamanho do complexo de Golgi, que é encontrado em todo o citoplasma ovocitário durante o bloqueio da meiose, e é fragmentado quando a mesma é retomada. As mitocôndrias também se redistribuem, passando a se localizar ao redor das gotículas de gordura, formando aglomerados que se distribuem no ovoplasma para que as necessidades energéticas necessárias na quebra da vesícula germinativa, na migração do fuso e na transição de meiose I para II sejam supridas pela produção de adenosina trifosfato (ATP) (SOMFAIA et al., 2012; ANGUITA et al., 2008).

Há ainda o aumento gradativo de lipídeos, provavelmente uma fonte energética extremamente importante para o desenvolvimento embrionário; a compactação do nucléolo e alinhamento dos grânulos corticais que se encontram dispersos por todo o citoplasma no ovócito imaturo e migram para a periferia do ovoplasma após a maturação, fazendo exocitose após a fecundação, visando modificações na matriz extracelular e impedindo também a poliespermia (FERREIRA et al., 2009).

Durante esse processo, as células que envolvem o ovócito também sofrem significativas transformações. As células do *cumulus* sintetizam ácido hialurônico, após estímulos de hormônios endógenos e fatores produzidos pelo ovócito, ficando suspensas em uma matriz de muco rico no ácido sintetizado, induzindo a expansão do *cumulus* durante o período de maturação (Figura 2). Frente à importância da etapa de MIV, pode-se dizer que a capacidade do ovócito de ser fecundado e gerar um embrião são indicadores de sua completa maturação (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

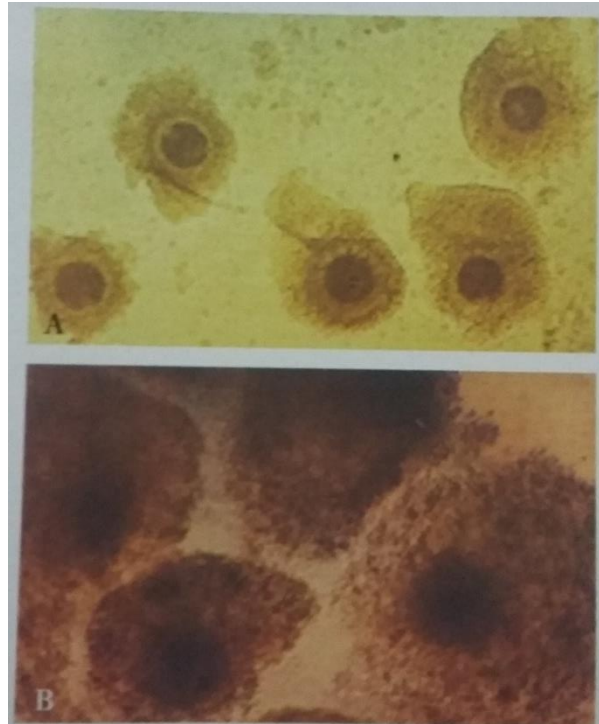


Figura 2. Ovócitos imaturos com o *cumulus* compacto (A) e maturados com o *cumulus* expandido (B). Fonte: Gonçalves, Figueiredo e Freitas, 2008.

In vivo, o processo de maturação se inicia com o pico de hormônio luteinizante (LH) no estro e, *in vitro*, com a retirada do ovócito do folículo e a manutenção do mesmo em meios de maturação, os quais são acrescidos de hormônios (GARCIA; AVELINO; VANTINI, 2012). O meio mais utilizado no processo de MIV é o *tissue culture médium* 199 (TCM-199) (GORDON, 1994), o qual não é específico para suprir as necessidades complexas e dinâmicas do complexo *cumulus*-ovócito durante a maturação, sendo modificado de acordo com a rotina de cada laboratório, podendo ser adicionado L-glutamina, bicarbonato de sódio, piruvato de sódio, hormônios, como o LH e o hormônio folículo estimulante (FSH), e soro fetal bovino (SFB) ou soro de vaca em estro. Também é necessária uma estufa que mantenha a atmosfera gasosa e a temperatura. A maturação de ovócitos bovinos é realizada em uma faixa de temperatura de 37 a 39°C por 22 a 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

2.1.4 Fertilização *in vitro*

A capacitação espermática compreende uma série complexa de eventos moleculares que ocorrem no espermatozoide após a maturação epididimária, o deixando apto a sofrer a reação acrossômica e fecundar o ovócito. *In vivo*, o processo acontece no trato

genital da fêmea, principalmente pela remoção do colesterol da membrana espermática (fator decapacitante). *In vitro*, o processo ocorre durante as fases de processamento do sêmen (PALHANO, 2008).

O espermatozoide capacitado tem a habilidade de se ligar à zona pelúcida do ovócito e sofrer uma reação acrossômica na presença de cálcio extracelular. Tal reação se inicia com uma cascata de eventos que levam ao aumento intracelular de cálcio, responsável por ativar substâncias fusogênicas, além de agir em fosfolípídeos de membrana, localizados na cabeça do espermatozoide. O processo de reação do acrossomo compreende a segmentação progressiva do mesmo e a fusão das membranas plasmática e acrossômica externa, permitindo a liberação de enzimas fundamentais para a fecundação do ovócito. Após fusão e incorporação do gameta masculino no ovócito, há a retomada da meiose, além da reorganização e endurecimento da zona pelúcida, conhecida como reação cortical, a qual evita a polispermia (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

O sêmen do touro deve ser preparado por técnicas que permitam a separação dos espermatozoides vivos dos demais componentes do sêmen e seus crioprotetores. A técnica mais utilizada para separação espermática é o gradiente descontínuo de Percoll®, o qual é constituído por partículas de sílica coloidal cobertas com polivinilpirrolidona, em diferentes concentrações para formar o gradiente necessário de separação espermática (SAMARDZIJA et al., 2006). O sêmen é colocado acima desses diferentes gradientes e centrifugado para que ocorra a separação, deixando os espermatozoides mortos e com baixa motilidade presos entre as partículas do meio, formando um pellet com as células móveis que serão utilizadas na FIV (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). O método denominado “Mini-Percoll®”, que consiste em utilizar volumes bastante reduzidos em relação aos utilizados no protocolo tradicional de Percoll®, vem sendo atualmente empregado com sucesso na FIV, seja com sêmen sexado ou convencional (MACHADO et al., 2009).

Após a maturação ovocitária e a separação dos espermatozoides viáveis, deve-se proporcionar um ambiente que permita o metabolismo do ovócito e das células do *cumulus* e mantenha a função espermática eficiente, além de realizar a capacitação espermática, já que esta etapa depende da qualidade dos ovócitos e dos espermatozoides utilizados (NETO, 2009). O meio mais utilizado na etapa de fertilização *in vitro* é o TALP-FERT que contém heparina, um glicosaminoglicano que atua na capacitação espermática. O co-cultivo de espermatozoides e ovócitos é realizado em um período que pode variar de 6 a 22 horas, a uma temperatura de 37 a 39°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. Os

espermatozoides são adicionados às gotas do meio de fertilização, em uma concentração que varia de 1 a 5×10^6 espermatozoides/mL de meio (SIRARD, 2017).

2.2 Cultivo e Desenvolvimento embrionário *in vitro*

Os prováveis zigotos são cultivados em laboratório em meio de cultivo baseado nos fluidos uterinos, como o fluido sintético de oviduto (SOF), que é o principal meio utilizado, classificado como um meio simples, desenvolvido e direcionado para a produção de embriões, podendo ser acrescido de aminoácidos, fosfatos, piruvato e lactato; por um período de 6 a 9 dias a uma temperatura de 39°C, atmosfera de baixa tensão de O₂ a 5% de CO₂ e umidade saturada, onde o zigoto passa por uma série de divisões mitóticas até a formação de blastocisto (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Esse processo é conhecido como clivagem e as células resultantes do mesmo são denominadas blastômeros, os quais se compactam por mudanças na arquitetura da sua superfície, formando uma única massa celular, denominada mórula compacta. Em seguida, nos estádios mais avançados da clivagem, há o acúmulo de fluido que contribui para a formação da blastocele, a cavidade do blastocisto. Em consequência do contínuo acúmulo de fluido e da divisão celular, o blastocisto se expande, dando continuidade ao desenvolvimento embrionário. A apoptose é um mecanismo celular de controle de células anormais, desnecessárias e em excesso e sua indução representa a adaptação do embrião às condições de estresse e permite a continuidade do desenvolvimento embrionário, sendo que, quando essa é induzida de forma excessiva, pode haver um bloqueio do desenvolvimento embrionário (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008; PALHANO, 2008).

Raramente, a proporção de embriões que atingem o estágio de blastocisto é superior à 40%. Comercialmente, há oscilações entre 25 e 35%. Esses resultados são variáveis decorrentes de vários fatores, como a qualidade e maturação do sêmen e do ovócito, habilidade do técnico, qualidade dos produtos empregados nos meios de cultivo, entre outros (NEVES; MIRANDA; TORTORELLA, 2010).

2.3 Sistemas de cultivo: bidimensional e tridimensional

De acordo com Araújo et al. (2014), o sistema de cultivo 2D é assim denominado por ocorrer em placas onde as células permanecem com uma de suas faces em contato direto

com a superfície da placa, causando o achatamento dessa face e prejudicando as comunicações existentes entre as células vizinhas. Embora a cultura de células 2D tenha sido crucial para o desenvolvimento da biologia moderna, ela recria inadequadamente o ambiente natural no qual as células residem. Essa limitação levou ao desenvolvimento de técnicas como o sistema de cultivo 3D, desenvolvido com o intuito de mimetizar o ambiente natural das células para reduzir a tensão que o COC's sofre quando cultivado em contato direto com a placa como acontece no cultivo 2D.

Na maturação ovocitária, o sistema 2D pode comprometer o crescimento ovocitário e a competência meiótica. Frente a isso, o sistema de cultivo 3D, vem sendo estudado com o objetivo de criar um ambiente *in vitro* que permita a manutenção da estrutura tridimensional do folículo, preservando a interação célula/célula, bem como evitando a aderência das células da granulosa a superfície da placa e conseqüentemente beneficiando o desenvolvimento ovocitário (JIN et al., 2010).

Existem diferentes formas de realizar o cultivo 3D: matrizes com componentes naturais, matrizes sintéticas, agitação contínua e nanopartículas associadas à levitação magnética (TELFER; MCLAUGHLIN, 2012). Descrito por Souza et al. (2010) pela primeira vez, o método de cultivo que utiliza nanopartículas associadas à levitação magnética é composto por nanopartículas de óxido de ferro, ouro e poli-L-lisina que após a adesão às células, são expostas a placa com ímãs colocada sobre a placa de cultivo, que permite a levitação das células, sendo necessária adaptar a concentração de nanopartículas ao tipo de célula cultivada no sistema. Estudos que compararam os sistemas de cultivo 2D e 3D com nanopartículas por levitação magnética utilizando o tecido adiposo branco, constataram que o cultivo 3D permitiu simular a vascularização e a lipogênese, restabelecendo interações *in vivo* (DAQUINAG; SOUZA; KOLONIN, 2013).

Tseng et al. (2013) criaram um bronquíolo no sistema 3D por meio da levitação magnética em conjunto com nanopartículas magnéticas. Para isso, foram co-cultivadas quatro tipos de células humanas do bronquíolo: endoteliais, musculares lisas, fibroblastos e células epiteliais. Os resultados mostraram que o sistema é válido, criando de forma rápida co-culturas 3D, mantendo o fenótipo e induzindo a formação de matriz extracelular. Ainda foram desenvolvidos modelos de co-cultura no mesmo sistema de cultivo de tumor de mama e de células da válvula aórtica, sugerindo que o sistema de cultivo pode servir como base para futuras experiências para entender a biologia de tais células, tornando possível testar a eficácia de fármacos em modelos *in vitro* (HOGAN; SOUZA; BIRLA, 2016; JAGANATHAN et al, 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Desenvolvimento

O projeto foi desenvolvido no laboratório de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia, no Campus Umuarama, na cidade de Uberlândia, no Estado de Minas Gerais.

3.2 Obtenção e Seleção de Ovócitos

Foram realizadas 12 rotinas do experimento. Os ovários foram obtidos a partir de vacas abatidas em abatedouro comercial, sem raça definida, armazenados e transportados em garrafa térmica a 37°C. A aspiração dos folículos antrais (diâmetro entre 3 e 8 milímetros) foi realizada imediatamente após a chegada dos ovários ao laboratório, utilizando seringa de 10 mL e agulha 18G. O conteúdo aspirado foi colocado em tubos de 50 mL (até atingir 40 mL cada tubo), mantidos em banho maria a 37°C por 15 minutos para sedimentação. O sobrenadante dos tubos foi descartado e o sedimento depositado em placas de Petri para o rastreamento dos ovócitos, com auxílio de estereoscópio (Olympus Optical®, modelo SZ-40/SZ-ST). Os ovócitos foram rastreados e selecionados, classificados em ovócitos bons, como sendo grau I e II de acordo com Stringfellow e Givens (2010) e ovócitos ruins, sendo selecionados os ovócitos de pior qualidade dos graus III e IV, que geralmente são descartados na PIVE comercial.

3.3 Maturação *in vitro* de ovócitos

Os ovócitos foram divididos em seis grupos experimentais: o grupo controle 2D de ovócitos bons (2D-B) e o grupo controle 2D de ovócitos ruins (2D-R), nos quais a maturação se deu pelo sistema bidimensional de cultivo; grupo 3D de ovócitos bons com a concentração de nanopartículas de 50 µL/mL (3D-50-B); grupo 3D de ovócitos ruins com a concentração de nanopartículas de 50 µL/mL (3D-50-R); grupo 3D de ovócitos bons com a concentração de nanopartículas de 75µL/mL (3D-75-B) e grupo 3D de ovócitos ruins com a concentração de nanopartículas de 75µL/mL (3D-75-R)(Figura 3).Foram utilizadas

nanopartículas compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina (NanoShuttle™-PL, n3D, Bioscience, Inc., Houston, TX, USA) que permitiram o cultivo 3D por levitação magnética.

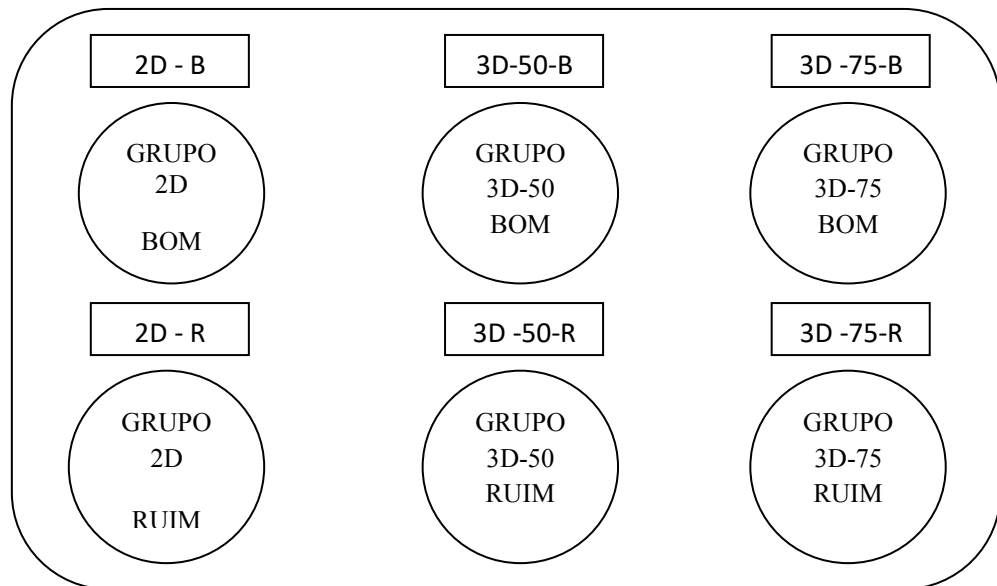


Figura 3. Esquema dos grupos experimentais utilizados na pesquisa. Fonte: Pessoal.

Os ovócitos, após rastreamento e seleção, foram transferidos para uma placa de Petri e lavados em meio de lavagem composto por TCM 199, SFB, piruvato e amicacina e posteriormente, transferidos para outra placa e lavados em meio de maturação composto por TCM 199, bicarbonato, SFB (0,11mg/mL), piruvato (22 µg/mL), amicacina (83mg/mL), LH (5 µg/mL) e FSH (0,5µg/mL).

Após as lavagens, os ovócitos foram divididos em dez para cada grupo experimental. Para incubação dos ovócitos com as nanopartículas, 10 estruturas foram colocadas em microtubos de 500µL/mL contendo 200µL/mL de meio de maturação. Os ovócitos do grupo controle foram colocados em microtubos contendo apenas meio de maturação e os ovócitos dos grupos de cultivo 3D foram colocados em microtubos contendo meio de maturação com a respectiva concentração de nanopartículas por grupo, a qual foi baseada na revisão de literatura de artigos que utilizaram o mesmo sistema 3D utilizado no trabalho (50µL/mL ou 75µL/mL).

Os microtubos foram mantidos em estufa úmida a 39°C e 5% de CO₂ por quatro horas, para adesão das nanopartículas aos ovócitos. Após esse período, os ovócitos foram transferidos para placa de 24 poços, cada microtubo correspondendo a um poço da placa (Figura 4 e Figura 5). Sobre a placa foi acoplado um drive magnético que permitiu que a levitação magnética dos ovócitos com as nanopartículas ocorresse. A placa foi mantida na

estufa sob as mesmas condições por mais 18 horas, alcançando um período total de maturação *in vitro* de 22 horas.



Figura 4. Retirada de ovócitos do microtubo para transferência para a placa de 24 poços. Fonte: Pessoal.

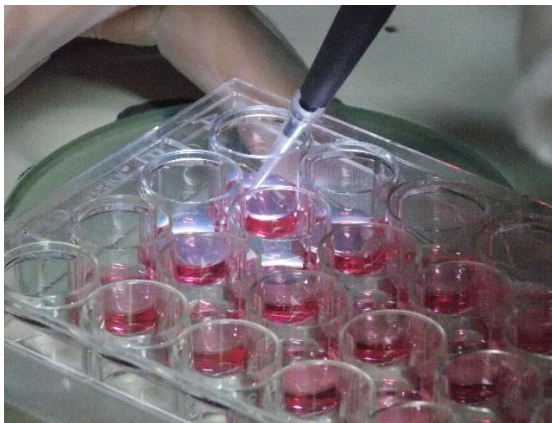


Figura 5. Transferência de ovócitos para a placa de 24 poços. Fonte: Pessoal.

3.4 Fertilização *in vitro*

Os ovócitos maturados foram lavados 3 vezes em meio de fecundação TALP-FERT e transferidos para a placa de FIV, a qual foi constituída de 6 gotas de meio FIV TALP-FERT acrescido de amicacina (83 mg/mL), solução de piruvato (10 μ g/mL), Penicilina-Hipotaurina-Epinefrina (PHE): 2 μ M de penicilina; 1 μ M de hipotaurina; 0,25 μ M de epinefrina; heparina e Albumina Sérica Bovina (BSA) livre de ácidos graxos essenciais (6 mg/mL). A placa foi colocada na estufa até a finalização da capacitação espermática.

As amostras congeladas de sêmen de um único touro, com fertilidade comprovada, utilizadas para a fertilização *in vitro*, foram obtidas em central de inseminação artificial. O sêmen passou pelo descongelamento em banho maria a 37°C por 30 segundos. Os espermatozoides foram submetidos ao processo de seleção e capacitação pelo método de centrifugação com gradientes descontínuos de mini-Percoll® adaptado de Parrish et al.

(1995), sendo realizado em microtubos de 1,5 mL com 400 μ L de Percoll 45% e 400 μ L de Percoll 90%, totalizando 800 μ L dos gradientes, submetidos a uma rotação de 3500 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos. Antes e após a capacitação, foi avaliada a motilidade e o vigor, além da concentração por contagem em câmara de Neubauer, com o auxílio de um microscópio de luz e a partir daí calculada a concentração de sêmen colocado por gota, sendo a dose inseminante calculada assim: $(100/\text{número de espermatozoides contados}) + (100 - \text{motilidade}) \% = \text{volume a ser adicionado por gota } (\mu\text{L/mL})$, gerando a quantidade de 1×10^6 espermatozoides/mL por gota de meio FIV.

Os ovócitos maturados de cada grupo foram colocados em sua respectiva gota de meio FIV, juntamente com os espermatozoides na concentração calculada. Os ovócitos e espermatozoides foram co-incubados na placa de FIV por um período de 18 horas, em estufa com 5% de CO₂ em ar, a 39°C e alta umidade.

3.5 Cultivo *in vitro* de embriões

Após o período da FIV, os prováveis embriões foram desnudados mecanicamente por meio de pipetações consecutivas, em seguida foram lavados 3 vezes em meio com base SOF suplementado com piruvato (0,11mg/mL), amicacina (83 mg/mL), BSA livre de ácidos graxos e baixa endotoxina (6mg/mL) e SFB e posteriormente transferidos para a placa de cultivo. O cultivo *in vitro* dos embriões foi realizado em placa de Petri, com 6 gotas de 100 μ L/mL do meio SOF cada. A placa de cultivo foi mantida em estufa úmida com 5% de CO₂ a 39°C por 7 dias. Quarenta e oito horas após a fertilização foram feitas as avaliações das taxas de clivagem dos embriões e sete dias após a FIV foram avaliados os embriões que alcançaram o estágio de blastocisto.

3.6 Análise das taxas de produção

Com auxílio de estereoscópio, a taxa de clivagem dos possíveis zigotos de cada grupo foi avaliada após 48 horas da FIV, sendo calculada da seguinte maneira: número de zigotos clivados / número de ovócitos totais que foram para o cultivo. A taxa de blastocisto também foi analisada com auxílio de estereoscópio, 7 dias após a FIV, a qual se deu pelo cálculo: número de blastocistos / número de ovócitos totais que foram para o cultivo. Foi feita

ainda uma relação entre o número de blastocistos formados e zigotos clivados de cada grupo, sendo calculada da seguinte forma: número de blastocistos / número de zigotos clivados.

3.7 Estatística

Com auxílio do programa SigmaPlot, versão 11, foram aplicados o teste de qui-quadrado e o teste de razão das chances (OddsRatio), que estima a probabilidade de ocorrência de um determinado evento (clivagem ou formação de blastocistos) visto a interferência de um fator (utilização dos sistemas 2D ou 3D), mostrando assim os efeitos dos tratamentos utilizados, onde o valor de $p < 0,05$ representa diferença significativa.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliando a taxa de clivagem dos zigotos acerca do número total de ovócitos cultivados, o grupo de ovócitos classificados como ruins, maturados no sistema 3D utilizando a concentração de 75 μ L/mL de nanopartículas, apresentou semelhante resultado aos grupos de ovócitos bons maturados em ambos os sistemas de cultivo, superando os ovócitos ruins maturados no sistema 2D (Tabela 1).

Um estudo realizado por Silva et al. (2015b), no qual foram cultivados folículos pré-antrais de caprinos em sistema tridimensional em matriz de alginato, em comparação com o sistema de cultivo 2D, a maior proporção de folículos viáveis foi observada no sistema de cultivo 3D, o que pode ser considerado um resultado semelhante ao encontrado no presente estudo, já que ovócitos ruins maturados no sistema 3D de cultivo (75 μ L/mL) apresentaram resultados semelhantes aos ovócitos bons maturados em ambos os sistemas de cultivo, demonstrando-se viáveis.

Observando-se as taxas de blastocistos sobre o total de ovócitos cultivados, é possível afirmar que o grupo de ovócitos bons maturados com a concentração de nanopartículas de 75 μ L/mL, apresentou taxas semelhantes ao grupo de ovócitos bons maturados no sistema 2D. Entretanto, se consideradas as taxas de blastocistos em relação ao número de zigotos clivados, os grupos de ovócitos maturados no sistema 3D na concentração de 75 μ L/mL, tanto bons como ruins, tiveram taxas semelhantes às do grupo de ovócitos bons maturados no sistema 2D de cultivo (Tabela 1).

A semelhança da taxa de blastocistos sobre o total de zigotos clivados, entre ovócitos ruins maturados em ambas as concentrações de nanopartículas no sistema de cultivo 3D e ovócitos bons maturados no sistema de cultivo 2D, mostra que o sistema de cultivo 3D pode influenciar ovócitos de qualidade inferior, pelo fato do mesmo manter a morfologia do folículo e mimetizar um ambiente similar à matriz extracelular do ovário *in vitro* (TELFER; MCLAUGHLIN, 2012).

Tabela 1. Taxas de clivagem e de produção de blastocistos de ovócitos bovinos maturados nos sistemas de cultivo 2D e 3D

GRUPOS	CLIVAGEM % (clivados/total)	BLASTOCISTOS% (blastocistos/total)	BLASTOCISTOS% (blastocistos/clivados)
2D-B	79,1 (129/163) ^A	37,4 (61/163) ^A	42,7 (61/129) ^{BC}
2D-R	59,8 (103/172) ^B	19,1 (33/172) ^B	32,0 (33/103) ^A
3D-50-B	74,3 (122/164) ^{AC}	27,4 (45/164) ^B	36,8 (45/122) ^{AB}
3D-50-R	65,1 (110/169) ^{BC}	20,1 (34/169) ^B	30,9 (34/110) ^A
3D-75-B	78,9 (135/171) ^A	42,1 (72/171) ^A	53,3 (72/135) ^C
3D-75-R	71,1 (113/159) ^{AC}	26,4 (42/159) ^B	37,1 (42/113) ^{AB}

Legenda: 2D-B: grupo de ovócitos bons, maturado no sistema de cultivo 2D; 2D-R: grupo de ovócitos ruins, maturado no sistema de cultivo 2D; 3D-50-B: grupo de ovócitos bons, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 50µL/mL e levitação magnética; 3D-50-R: grupo de ovócitos ruins, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 50µL/mL e levitação magnética; 3D-75-B: grupo de ovócitos bons, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 75µL/mL e levitação magnética; 3D-75-R: grupo de ovócitos ruins, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 75µL/mL e levitação magnética. Letras diferentes na mesma coluna indicam significância estatística ($p < 0,05$).

Ao aplicar o teste de razão das chances para avaliar a chance de clivagem entre os diferentes grupos de ovócitos foi possível observar que todos os grupos que utilizaram ovócitos bons na fertilização, independente do sistema de cultivo utilizado, apresentaram chances semelhantes de clivagem (Tabela 2). Serafim (2013), ao utilizar o sistema 3D em folículos pré-antrais e antrais de caninos, concluiu que o sistema não conferiu nenhum benefício adicional na foliculogênese *in vitro*, o que pode ser diferente do presente estudo, pelo fato de ovócitos bons, independente do sistema de cultivo utilizado, demonstraram semelhante chance de clivagem.

Tabela 2. Teste de razão das chances para taxas de clivagem de ovócitos classificados como bons, maturados nos sistemas de cultivo 2D e 3D

GRUPOS	ODDS RATIO (I.C. 95%)	VALOR – P
2D-B x 3D-50-B 79,1(129/163) x 74,3(122/164)	1,3 (0,7 – 2,1)	0,3756
2D-B x 3D-75-B 79,1(129/163) x 78,9(135/171)	1,0 (0,5 – 1,7)	0,9275
3D-50-B x 3D-75-B 74,3(122/164) x 78,9(135/171)	1,2 (0,7 – 2,1)	0,3913

Legenda: 2D-B: grupo de ovócitos bons, maturado no sistema de cultivo 2D; 3D-50-B: grupo de ovócitos bons, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 50µL/mL e levitação magnética; 3D-75-B: grupo de ovócitos bons, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 75µL/mL e levitação magnética. I.C.: intervalo de confiança.

Com o mesmo teste, percebeu-se que mesmo com concentrações iguais de sêmen utilizadas na FIV, ovócitos ruins cultivados no sistema 3D na concentração de 75µL/mL apresentaram 1,6 vezes mais chances de clivar do que ovócitos ruins maturados no sistema 2D (Tabela 3).

Em um estudo no qual folículos isolados de murinos foram cultivados em diferentes concentrações de hidrogéis de colágeno, taxas de mais de 90% de viabilidade celular foram registradas nos tratamentos com maiores concentrações da matriz, o que pode se assemelhar a este estudo, já que ovócitos ruins cultivados no sistema 3D com a maior concentração de nanopartículas apresentaram mais chances de clivar, fato que pode ser associado à melhor levitação dos ovócitos em uma maior concentração de nanopartículas (JOO et al., 2016).

Tabela 3. Teste de razão das chances para taxas de clivagem de ovócitos classificados como ruins, maturados nos sistemas de cultivo 2D e 3D

GRUPOS	ODDS RATIO (I.C. 95%)	VALOR – P
2D-R x 3D-50-R 59,8(103/172) x 65,1(110/169)	1,2 (0,8 – 1,9)	0,3785
2D-R x 3D-75-R 59,8(103/172) x 71,1(113/159)	1,6 (1,0 – 2,6)	0,0434
3D-50-R x 3D-75-R 65,1(110/169) x 71,1(113/159)	1,3 (0,8 – 2,1)	0,2975

Legenda: 2D-R: grupo de ovócitos ruins, maturado no sistema de cultivo 2D; 3D-50-R: grupo de ovócitos ruins, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 50 μ L/mL e levitação magnética; 3D-75-R: grupo de ovócitos ruins, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 75 μ L/mL e levitação magnética. I.C.: intervalo de confiança.

Notou-se ainda que ovócitos bons maturados no sistema tradicional de cultivo apresentam 2,5 vezes mais chances de clivar do que ovócitos ruins, porém quando o sistema 3D foi utilizado, as chances de clivagem foram semelhantes, independente da qualidade dos ovócitos e da concentração de nanopartículas utilizada (Tabela 4). Também foi observado que ovócitos ruins, quando cultivados em sistema 3D com a concentração de 75 μ L/mL de nanopartículas, apresentaram chances semelhantes de clivagem aos ovócitos bons com maturação tanto no sistema bidimensional, quanto no sistema tridimensional na concentração de 50 μ L/mL (Tabela 5). A explicação para as taxas de clivagem serem semelhantes em ovócitos bons e ruins, ao se utilizar o sistema 3D de cultivo, deve-se a preservação, pelo mesmo, das principais características morfológicas folicular e ovocitárias (BARRETT; SHEA; WOODRUFF, 2010).

Tabela 4. Teste de razão das chances de clivagem de ovócitos maturados no mesmo sistema de cultivo, comparando as diferentes classificações (bons e ruins)

GRUPOS	ODDS RATIO (I.C. 95%)	VALOR – P
2D-B x 2D-R 79,1(129/163) x 59,8(103/172)	2,5 (1,5 – 4,1)	0,0002
3D-50-B x 3D-50-R 74,31(122/164) x 65,1(110/169)	1,5 (0,9 – 2,4)	0,0842
3D-75-B x 3D-75-R 78,9(135/171) x 71,1(113/159)	1,5 (0,9 – 2,5)	0,1267

Legenda: 2D-B: grupo de ovócitos bons, maturado no sistema de cultivo 2D; 2D-R: grupo de ovócitos ruins, maturado no sistema de cultivo 2D; 3D-50-B: grupo de ovócitos bons, maturado no sistema de cultivo 3D com

nanopartículas na concentração de 50µL/mL e levitação magnética; 3D-50-R: grupo de ovócitos ruins, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 50µL/mL e levitação magnética; 3D-75-B: grupo de ovócitos bons, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 75µL/mL e levitação magnética; 3D-75-R: grupo de ovócitos ruins, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 75µL/mL e levitação magnética. I.C.: intervalo de confiança.

Tabela 5. Teste de razão das chances para taxas de clivagem comparando ovócitos classificados como bons e ruins e os diferentes sistemas de maturação ovocitária

GRUPOS	ODDS RATIO (I.C. 95%)	VALOR – P
2D-B x 3D-50-R 79,1(129/163) x 65,1(110/169)	2,0 (1,2 – 3,2)	0,0071
2D-B x 3D-75-R 79,1(129/163) x 71,1(113/159)	1,5 (0,9 – 2,5)	0,1219
3D-50-B x 2D-R 74,3(122/164) x 59,8(103/172)	1,9 (1,2 – 3,0)	0,0067
3D-50-B x 3D-75-R 74,3(122/164) x 71,1(113/159)	1,1 (0,7 – 1,9)	0,5856
3D-75-B x 2D-R 78,9(135/171) x 59,8(103/172)	2,5 (1,5 – 4,0)	0,002
3D-75-B x 3D-50-R 78,9(135/171) x 65,1(110/169)	2,0 (1,2 – 3,2)	0,0064

Legenda: 2D-B: grupo de ovócitos bons, maturado no sistema de cultivo 2D; 2D-R: grupo de ovócitos ruins, maturado no sistema de cultivo 2D; 3D-50-B: grupo de ovócitos bons, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 50µL/mL e levitação magnética; 3D-50-R: grupo de ovócitos ruins, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 50µL/mL e levitação magnética; 3D-75-B: grupo de ovócitos bons, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 75µL/mL e levitação magnética; 3D-75-R: grupo de ovócitos ruins, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 75µL/mL e levitação magnética. I.C.: intervalo de confiança.

O teste de razão das chances também foi aplicado para as taxas de produção de blastocistos, no qual foi possível perceber que ovócitos bons maturados no sistema 3D utilizando uma concentração de 75µL/mL de nanopartículas, apresentaram 1,9 vezes mais chances de produzir blastocistos do que o grupo de ovócitos bons maturados no mesmo sistema utilizando uma concentração de nanopartículas de 50µL/mL (Tabela 6).

Tabela 6. Análise de razão das chances para produção de blastocistos de ovócitos classificados como bons, maturados nos sistemas de cultivo 2D e 3D

GRUPOS	ODDS RATIO (I.C. 95%)	VALOR – P
2D-B x 3D-50-B 47,2(61/129) x 36,8(45/122)	1,5 (0,9 – 2,5)	0,1236
2D-B x 3D-75-B 47,2(61/129) x 53,3(72/135)	1,2 (0,7 – 2,0)	0,3903
3D-50-B x 3D-75-B 36,8(45/122) x 53,3(72/135)	1,9 (1,1 – 3,2)	0,0118

Legenda: 2D-B: grupo de ovócitos bons, maturado no sistema de cultivo 2D; 3D-50-B: grupo de ovócitos bons, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 50µL/mL e levitação magnética; 3D-75-B: grupo de ovócitos bons, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 75µL/mL e levitação magnética. I.C.: intervalo de confiança.

Já as chances de produção de blastocistos se equivalem quando são utilizados ovócitos ruins independente do sistema de cultivo e da concentração de nanopartículas utilizados (Tabela 7). Os ovócitos ruins possuem citoplasma com cor e granulação anormais ou com células expandidas com aspecto apoptótico, os quais, ao serem analisados como um todo e comparados entre si, não parecem ser viabilizados com o uso do sistema 3D, já que as chances de produção de blastocistos se equivalem, independente do sistema de cultivo utilizado (STRINGFELLOW; GIVENS, 2010).

Tabela 7. Teste de razão das chances para taxas de blastocistos de ovócitos classificados como ruins, maturados nos sistemas de cultivo 2D e 3D

GRUPOS	ODDS RATIO (I.C. 95%)	VALOR – P
2D-R x 3D-50-R 32,0 (33/103) x 30,9 (34/110)	1,0 (0,6 – 1,8)	0,9762
2D-R x 3D-75-R 32,0 (33/103) x 37,1 (42/113)	1,2 (0,7 – 2,2)	0,5171
3D-50-R x 3D-75-R 30,9 (34/110) x 37,1 (42/113)	1,3 (0,7 – 2,3)	0,3983

Legenda: 2D-R: grupo de ovócitos ruins, maturado no sistema de cultivo 2D; 3D-50-R: grupo de ovócitos ruins, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 50µL/mL e levitação magnética; 3D-75-R: grupo de ovócitos ruins, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 75µL/mL e levitação magnética. I.C.: intervalo de confiança.

Quando ovócitos são maturados utilizando o sistema de levitação magnética com 50µL/mL de nanopartículas, no teste de razão, as chances de produção de blastocistos são as mesmas ($p > 0,05$), independente de sua qualidade (Tabela 8).

Tabela 8. Teste de razão das chances de blastocistos de ovócitos maturados no mesmo sistema de cultivo, comparando as diferentes classificações (bons e ruins)

GRUPOS	ODDS RATIO (I.C. 95%)	VALOR – P
2D-B x 2D-R 47,2 (61/129) x 32,0 (33/103)	1,9 (1,1 – 3,2)	0,0267
3D-50-B x 3D-50-R 36,8 (45/122) x 30,9 (34/110)	1,3 (0,7 – 2,2)	0,4120
3D-75-B x 3D-75-R 53,3 (72/135) x 37,1 (42/113)	1,9 (1,1 – 3,2)	0,0157

Legenda: 2D-B: grupo de ovócitos bons, maturado no sistema de cultivo 2D; 2D-R: grupo de ovócitos ruins, maturado no sistema de cultivo 2D; 3D-50-B: grupo de ovócitos bons, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 50µL/mL e levitação magnética; 3D-50-R: grupo de ovócitos ruins, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 50µL/mL e levitação magnética; 3D-75-B: grupo de ovócitos bons, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 75µL/mL e levitação magnética; 3D-75-R: grupo de ovócitos ruins, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 75µL/mL e levitação magnética. I.C.: intervalo de confiança.

O teste também demonstrou que ovócitos ruins maturados em sistema 3D com nanopartículas na concentração de 75µL/mL, apresentaram chances semelhantes de produzir blastocistos quando são comparados aos ovócitos bons cultivados no sistema 2D (tabela 9). Resultados semelhantes entre as concentrações de nanopartículas utilizadas no sistema 3D de cultivo (75µL/mL ou 50µL/mL) não foram obtidos provavelmente pelo fato da concentração de 50µL/mL não ser capaz de levantar o peso dos ovócitos, não possibilitando seu desenvolvimento como na concentração de 75µL/mL.

Tabela 9. Teste de razão das chances para taxas de blastocistos comparando ovócitos classificados como bons e ruins e os diferentes sistemas de maturação ovocitária

GRUPOS	ODDS RATIO (I.C. 95%)	VALOR – P
2D-B x 3D-50-R 47,2 (61/129) x 30,9 (34/110)	2,0 (1,1 – 3,4)	0,0144
2D-B x 3D-75-R 47,2 (61/129) x 37,1 (42/113)	1,5 (0,9 – 2,5)	0,1448
3D-50-B x 2D-R 36,8 (45/122) x 32,0 (33/103)	1,2 (0,7 – 2,1)	0,5350
3D-50-B x 3D-75-R 36,8 (45/122) x 37,1 (42/113)	1,0 (0,5 – 1,7)	0,9280
3D-75-B x 2D-R 53,3 (72/135) x 32,0 (33/103)	2,4 (1,4 – 4,1)	0,0017
3D-75-B x 3D-50-R 53,3 (72/135) x 30,9 (34/110)	2,5 (1,5 – 4,3)	0,0007

Legenda: 2D-B: grupo de ovócitos bons, maturado no sistema de cultivo 2D; 2D-R: grupo de ovócitos ruins, maturado no sistema de cultivo 2D; 3D-50-B: grupo de ovócitos bons, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 50µL/mL e levitação magnética; 3D-50-R: grupo de ovócitos ruins, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 50µL/mL e levitação magnética; 3D-75-B: grupo de ovócitos bons, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 75µL/mL e levitação magnética; 3D-75-R: grupo de ovócitos ruins, maturado no sistema de cultivo 3D com nanopartículas na concentração de 75µL/mL e levitação magnética. I.C.: intervalo de confiança.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que o sistema de cultivo 3D, composto por nanopartículas e levitação magnética, quando utilizado na concentração de $75\mu\text{L}/\text{mL}$ de nanopartículas, viabilizou ovócitos ruins, resultando em taxas de clivagem e de produção de blastocistos semelhantes às dos grupos de ovócitos bons maturados no sistema 2D ou no sistema 3D de cultivo, possibilitando assim, a maior utilização de tais ovócitos durante a PIVE, aumentando a produtividade da técnica.

REFERÊNCIAS

- ANGUITA, B. et al. Total RNA and protein content, Cyclin B1 expression and developmental competence of prepubertal goat oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.103, p.290-303, 2008.
- ARAÚJO, V. R. et al. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, p. 78, 2014.
- BARRETT, S. L.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. Noninvasive index of cryorecovery and growth potential for human follicles *in vitro*. **Biology of reproduction**, v. 82, p. 1180–1189, 2010.
- 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. 336–344, 2013.
- FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, p. 836-848, 2009.
- GARCIA, J.M.; AVELINO, K.B.; VANTINI, R. **Estado da Arte da Fertilização *in vitro* em Bovinos**. 2012. Trabalho apresentado ao 1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina, 2012. Não publicado.
- GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. 395 p.
- GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. 2. nd. Wallingford: CABI International, 1994. 640 p.
- GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.2, p.82-94, abr./jun. 2009.
- HOGAN, M.; SOUZA, G.; BIRLA, R. Assembly of a functional 3D primary cardiac construct using magnetic levitation. **AIMS Bioengineering**, v. 3, n. 3, p. 277–288, 2016.
- JAGANATHAN, H. et al. Three-Dimensional *in vitro* co-culture model of breast tumor using magnetic levitation. **Scientific Reports**, v. 4, p. 6468, 2014.
- JIN, S.Y. et al. A novel two-step strategy for in vitro culture of early stage ovarian follicles in the mouse. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 8, p. 2633-9, 2010.

JOO S. et al. The effect of collagen hydrogel on 3D culture of ovarian follicles. **Biomedical Materials**, v. 11, p. 065009, 2016.

MACHADO, G.M. et al. Effect of Percoll volume duration and force of centrifugation on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v.71, p.1289-1297, 2009.

NETO, J.O.C. **Avaliação da qualidade de espermatozoide bovino criopreservado após sexagem por citometria de fluxo e sua utilização na produção *in vitro* de embriões**. 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L.; TORTORELLA, R. D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v.39, p.418, 2010.

PALHANO, H.B. **Reprodução em Bovinos: Fisiopatologia, Terapêutica, Manejo e Biotecnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros, 2008. 249 p.

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, p. 859-869, 1995.

PONTES, J.H.F. et al. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nellore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v.75, p.1640-1646, 2011.

SAMARDZIJA, M. et al. A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. **Animal Reproduction Science**, v.91, p.237-247, 2006.

SERAFIM, M. K. B. **Definição de um meio de cultivo para o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caninos isolados**. 2013. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2013.

SILVA, G. M. et al. *In vitro* development of secondary follicles from pre-pubertal and adult goats cultured in two-dimensional or three-dimensional systems. **Zygote**, v. 23, n. 4, p. 475–484, 2015b.

SIRARD, M. A. The influence of *in vitro* fertilization and embryo culture on the embryo epigenetic constituents and the possible consequences in the bovine model. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 8, p. 411-417, 2017.

SOMFAI, T. et. al. The effect of ovary storage and *in vitro* maturation on mRNA levels in bovine oocytes; a possible impact of maternal ATP1A1 on blastocyst development in slaughterhouse-derived oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v.57, p.723–730, 2011.

SOMFAIA, T. et al. 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. et. al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. **Nature Nanotechnology**, v. 5, p. 291-296, 2010.

STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D. **Manual of the International Embryo Transfer Society : a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures**. 4 th. Illinois: International Embryo Transfer Society, 2010. 200 p.

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. et al. Assembly of a three-dimensional multitype bronchiole coculture model using magnetic levitation. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v.19, p. 665-675, 2013.