

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

MARCO TÚLIO MARTINS SOUZA

**EFEITO DO CULTIVO *IN VITRO* TRIDIMENSIONAL NA TAXA
EMBRIONÁRIA DE BOVINOS**

UBERLÂNDIA

2019

MARCO TÚLIO MARTINS SOUZA

**EFEITO DO CULTIVO *IN VITRO* TRIDIMENSIONAL NA TAXA
EMBRIONÁRIA DE BOVINOS**

Projeto de pesquisa apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária da
Universidade Federal de Uberlândia,
como requisito parcial à aprovação na
disciplina de Trabalho de Conclusão de
Curso 2

Orientador(a): Profa. Dra. Ricarda Maria
dos Santos

Coorientador(a): Mayara Mafra Soares

UBERLÂNDIA

2019

MARCO TÚLIO MARTINS SOUZA

**EFEITO DO CULTIVO *IN VITRO* TRIDIMENSIONAL NA TAXA
EMBRIONÁRIA DE BOVINOS**

Trabalho de monografia apresentado a Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Como requisito à aprovação na disciplina de Trabalho de conclusão de curso II.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Uberlândia, 10 de Julho de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Ricarda Maria dos Santos
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Prof. Dr. José Octávio Jacomini
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Médico Veterinário Muller Carrara Martins
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus, pois sem ele nada seria possível.

A minha família, meus pais Renata e Túlio e minha irmã Isabella, por todo apoio e incentivo para que seguisse meus objetivos. Sem vocês não teria chegado até aqui.

A minha orientadora, Prof. Dra. Ricarda Maria dos Santos, pela confiança neste projeto. Agradeço também por meio do Prof. Ricarda toda a equipe do laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia, em especial a Mayara e Graci.

Aos meus amigos, os que deixei na minha cidade natal que mesmo distantes fisicamente, sempre se fizeram presentes. E aos amigos que cultivei em Uberlândia, que na rotina se tornaram minha família, compartilhando das alegrias e tristezas desse "mundo" chamado UFU.

RESUMO

No presente experimento analisou-se a produção de embriões bovinos submetidos ao sistema 3D por levitação magnética associada à nanopartículas compostas por ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina, comparado ao sistema tradicional 2D de produção *in vitro* de embriões. Foi testado o sistema 3D na etapa de cultivo *in vitro* em diferentes qualidades de ovócitos (BOM e RUIM) nas concentrações de 50 μL e 75 μL de nanopartículas. A avaliação do resultado foi baseada das taxas de clivagem e formação de blastocisto, sendo a análises estatísticas realizadas por meio do software Sigma Plot versão 11.0 (Systat Software Inc, San Jose, California, EUA). A clivagem apresentou resultados similares em cultivo bidimensional (2D) e tridimensional (3D) de diferentes concentrações de nanopartículas de diferentes qualidades de ovócitos testados. Diferente da formação de blastocisto, que não se formou em nenhum dos tratamentos, devido a provável formação de campo magnético promovido pelo drive magnético na etapa de cultivo *in vitro*, já que ambos os tratamentos 2D e 3D foram cultivados na presença do drive magnético.

Palavras-chave: Produção *in vitro* de embriões, levitação magnética.

ABSTRACT

The present experiment analyzed a production of bovine embryos submitted to the 3D system by magnetic levitation associated with nanoparticles composed of gold, iron oxide and poly-L-lysine, compared to the traditional 2D system of PIVE. In which the 3D system was tested *in vitro* in different doses of ovules (BOM and RIM) in concentrations of 50 μL and 75 μL of nanopart. Sigma Plot was version 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, California, USA). The cleavage presents similar results in a two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) environment of different groups of nanoparticles of different qualities of oocytes tested. Difference in the formation of magnetic field promoted by the gold nanoparticles, iron hydroxide and poly-L-lysine when taken to the magnetic disk in the *in vitro* culture stage, in which both 2D and 3D treatments were cultivated in the presence of the magnetic drive.

Keywords: *in vitro* embryo production, magnetic levitation.

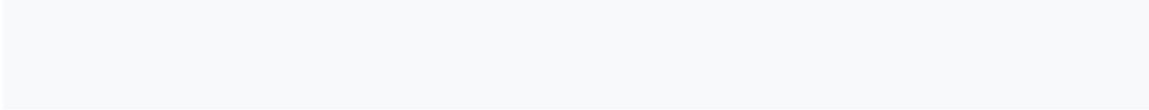
LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Experimento – Efeito do cultivo *in vitro* tridimensional associado a nanopartículas magnéticas na taxa embrionária de bovinos.

Figura 2 – Prováveis zigotos em sistema de cultivo 3D de levitação magnética associado a nanopartículas de ouro, ferro e polo-l-lisina.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem da proporção de clivagem e proporção da formação de blastocisto.



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
3. REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	13
3.2 Cultivo embrionário	14
3.3 Sistema de Cultivo Tradicional Bidimensional (2D)	16
3.4 Sistema de Cultivo Tridimensional (3D).....	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS:.....	18
4.1 Local e Obtenção e seleção dos ovócitos	18
4.3 Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	19
4.4 Análises de taxa de produção.....	21
4.5 Análise Estatística	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÃO.....	25
REFERÊNCIAS	26

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica reprodutiva que visa aumentar a produção de animais geneticamente superiores (Varago et al., 2008). Para isso, permite que ocorra as etapas que compõe a PIVE, as quais são: maturação *in vitro* de ovócitos (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* de embriões (CIV) que darão origem ao futuro embrião fora do útero do animal, em ambiente laboratorial (GONÇALVES et al., 2008).

Na etapa de MIV, os ovócitos recebem estímulos provenientes do meio no qual estão inseridos para finalizar a meiose envolvendo alterações nucleares e citoplasmáticas essenciais para a fecundação e posterior desenvolvimento embrionário (DADARWAL et al., 2015). Caso esses estímulos não sejam eficientes, os ovócitos não serão fecundados ou não terão capacidade de dar continuidade ao desenvolvimento do embrião (MEIRELLES et al., 2004). Posteriormente, na etapa de FIV, ocorre o encontro do espermatozoide com o ovócito que vai formar o zigoto (YANG et al., 1993; GONÇALVES et al., 2008). Finalizadas as etapas de MIV e FIV, o zigoto, passará por diversas divisões celulares chamadas de clivagem até se desenvolver em blastocisto na etapa de CIV (SANGILD et al., 2000), sendo de suma importância ter um ambiente controlado para que ocorra esse desenvolvimento celular (NAGAI, 2001).

Apesar dos avanços, essa biotécnica ainda apresenta desempenho aquém do ideal no que se refere à produção de embriões, com uma taxa de 40% dos ovócitos atingindo o estágio de blastocistos (LONERGAN; FAIR, 2008) para laboratórios comerciais e 30 % em ambiente de pesquisa (MAPLETOFT, 2013). Estes índices permanecem estagnados sem aumento significativo da produção. Assim, o desenvolvimento de estudos para encontrar novos métodos de cultivo celular para aumentar as taxas de produção na PIVE e melhorar a qualidade dos blastocistos é de grande relevância científica.

O atual sistema de cultivo da PIVE, denominado bidimensional (2D), apresenta diversas desvantagens, devido ao fato de as células permanecerem em contato direto com a placa, causando o achatamento celular, o qual compromete o crescimento ovocitário, a

competência meiótica e o desenvolvimento embrionário (ARAÚJO et al., 2014). Devido esta ocorrência, foram desenvolvidos sistemas de cultivo tridimensional (3D), dentre eles o sistema de levitação magnética, o qual se baseia na adesão de nanopartículas compostas por ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina, em conjunto com drive magnético colocado sobre a placa de cultivo, formando assim um campo de levitação celular magnético, mimetizando o ambiente natural de desenvolvimento celular, reduzindo a tensão ocasionada no cultivo bidimensional (2D) (LEIBFRIELD-RUTLEGE, 1999).

Em vista disso, levantou-se a hipótese que este sistema tridimensional de cultivo *in vitro* pode favorecer o desenvolvimento e qualidade embrionária. Portanto com este experimento visou-se analisar a maturação de ovócitos e a produção de embriões bovinos submetidos ao sistema tridimensional (3D) por levitação magnética associada à nanopartículas compostas por ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina, comparada ao sistema bidimensional tradicional (2D) na produção *in vitro* de embriões (PIVE).

2. OBJETIVOS

Analisar a produção embrionária de zigotos bovinos submetidos ao cultivo *in vitro* (CIV) de embriões em sistema tridimensional (3D), comparada ao sistema tradicional bidimensional (2D) na produção *in vitro* de embriões (PIVE).

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) consiste na formação de um novo indivíduo através da interação do espermatozoíde com o ovócito em ambiente laboratorial (GONÇALVES et al., 2008). Esta biotécnica, pode ser utilizada em animais pré-púberes, gestantes ou lactantes e animais que apresentam problemas de fertilidade (BRACKETT, ZUELKE, 1993).

O processo de maturação abrange uma série de mudanças no citoplasma e no núcleo do ovócito, para que este se torne apto à fecundação com consequente desenvolvimento até o estágio de blastocisto (DADARWAL et al., 2015). Observa-se que o ovócito durante todo seu desenvolvimento encontra-se na fase diplóteno da prófase I ou estágio de vesícula germinativa (VG). Nessa etapa ocorre a retomada da meiose ou maturação nuclear de forma fisiológica *in vivo* com a ovulação, após o pico pré-ovulatório de LH, ou com a retirada do ovócito do ambiente folicular e suplementação exógena do hormônio no ambiente *in vitro*, uma vez que o ovócito se encontrava em dormência na fase de diplóteno da prófase I. Com a retomada do desenvolvimento, ocorre o rompimento da vesícula germinativa e liberação do primeiro corpúsculo polar. Desta forma, constata-se que a maturação nuclear do ovócito abrange a progressão do estágio de diplóteno da prófase (meiose I) até a fase da metáfase (meiose II) (PANGAS et al., 2003). Além disso, é necessário que os ovócitos apresentem, durante a fase final do crescimento folicular, a competência de completar a maturação citoplasmática, e assim, suportar o desenvolvimento embrionário (BLONDIN et al., 2002; LEQUARRE et al., 2005).

A etapa de fecundação refere-se ao processo em que o espermatozoide entra em contato com o ovócito, gerando o zigoto. No processo *in vivo*, os espermatozoides necessitam chegar até a ampola da tuba uterina para fecundar o ovócito. Durante esse caminho percorrido, as substâncias presentes no sistema reprodutor da fêmea estimulam a capacitação dos espermatozoides, situação em que ocorrem modificações bioquímicas resultado na hiperativação espermática. Essa capacitação espermática possibilita a ligação da membrana do espermatozoide a receptores específicos na zona pelúcida do ovócito,

ocorrendo a reação acrossômica e fecundação. Já no procedimento *in vitro* para que ocorra esse processo de capacitação, deve haver um ambiente próprio, com a presença de agentes capacitantes, a fim de viabilizar o metabolismo do ovócito, e manter a função espermiática eficaz para que ocorra uma hiperativação e capacitação eficientes, resultando então na fecundação (YANG et al., 1993; ASSUMPÇÃO et al., 2002; GONÇALVES et al., 2007).

Após a maturação e fecundação, o zigoto passa por inúmeras divisões celulares até formar um blastocisto. No entanto, há um período de risco para o desenvolvimento do embrião logo após a fecundação que ocorre na transição materno zigótica, em que ocorre ativação do genoma do embrião e de suas proteínas, os quais deixam de ser produzidos pelo transcrito materno (YAN et al., 1993; ASSUMPÇÃO et al., 2002; GONÇALVES et al., 2007). Enquanto o zigoto está em desenvolvimento, é avaliada a taxa de clivagem com 48 a 72 horas após a fecundação e taxa de blastocistos no 7º dia de cultivo.

Durante o processo da PIVE é necessário cumprir as exigências adequadas para que haja sucesso no desenvolvimento da célula, a exemplo do ambiente, a uma temperatura de 39° C com atmosfera controlada (5% de oxigênio, 5% de gás carbônico e 90% de nitrogênio e umidade saturada) (GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008).

3.2 Cultivo embrionário

No cultivo embrionário ocorrem diversas alterações morfológicas no zigoto até que ocorra a diferenciação em blastocisto, período esse chamado de pré-implantação (WATSON et al., 2004). Dentre os diversos eventos que caracterizam esse período, está o estímulo do genoma embrionário, considerado um momento crítico. Visto que, é o período no qual ocorre a ativação do genoma embrionário e a síntese de novas proteínas, que passam a ser realizadas pelos transcritos embrionários ao invés dos transcritos maternos e passam a conduzir o desenvolvimento inicial (STITZEL; SEYDOUX, 2007). Esse fenômeno é um processo complexo que requer uma série coordenada de modificações nucleares e citoplasmáticas. Segundo Kanka (2003), estas modificações ocorridas no início, na estrutura da cromatina de embriões em estádios iniciais têm um significativo papel na ativação do genoma, entretanto não são o bastante para ativar a

transcrição. A ocorrência da ativação do genoma em ruminantes, ocorre entre o estágio de 8-16 células, quando acontecem as mais importantes alterações na ultraestrutura do nucléolo do blastômero e nos padrões de síntese protéica (MEMILI; FIRST, 2000).

Porém há diferenças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas entre o estágio embrionário denominado zigoto e o estágio final blastocistos. E dentre as principais mudanças morfológicas do embrião verifica-se a compactação dos blastômeros (mórula compacta) e o desenvolvimento da blastocele (blastocisto inicial) (BIGGERS et al., 1988). No que diz respeito a compactação dos blastômeros, esta está relacionada ao estabelecimento da polaridade dos blastômeros, apresentando uma modificação nos mecanismos homeostáticos disponíveis para o embrião. É caracterizada por um aumento do contato celular entre blastômeros, por meio de bases moleculares de agregação, regidas por moléculas de adesão presentes em sua superfície que impede limites celulares individuais (WATSON; BARCROFT, 2001).

Após a compactação, as células embrionárias próximas à zona pelúcida (ZP) iniciam a formação de complexos de adesão adicionais, junções tight, que estabelecem seus sistemas de transporte de íons em preparação para a formação do blastocisto (FLEMING et al., 2000), o qual é caracterizado pela diferenciação de células do trofoderma, que se encontram mais externamente e envolvem a blastocele e pela formação da massa celular interna (GOPICHANDRAN; LEESE 2003). Vários fatores transcricionais estão envolvidos na gênese dessas duas linhagens celulares que compõem o blastocisto envolvidos diretamente na formação do trofectoderma e no desenvolvimento da massa celular interna (HOME et al., 2009).

As condições de cultivo embrionário *in vitro* são consideradas muito importantes para que seja proporcionado todo aporte necessário para que ocorra desenvolvimento celular citado acima, resultando em bons índices de produção. Em vista disso, pesquisas tem sido realizadas visando avaliar o efeito que diferentes fatores, intrínsecos e extrínsecos, que possam exercer sobre o metabolismo e capacidade de desenvolvimento destes embriões, como por exemplo, a composição dos meios de cultivo, condições de temperatura e atmosfera gasosa, adição de aminoácidos, vitaminas, macromoléculas e fatores de crescimento e o uso de diversos sistemas de cultivo durante esta fase de desenvolvimento embrionário (NAGAI, 2001).

3.3 Sistema de Cultivo Tradicional Bidimensional (2D)

O atual sistema de cultivo da PIVE é considerado bidimensional (2D) por acontecer em placas onde as células permanecem com uma de suas superfícies em contato direto com a placa (ARAÚJO et al., 2014). Nesta técnica, permite que as células sejam remodeladas, de modo que ocorra alteração morfológica da célula se diferindo assim, ao que ocorre *in vivo*. Interferindo assim no crescimento oocitário, a competência meiótica e o desenvolvimento embrionário.

Mediante os aspectos negativos apresentados neste cultivo, salienta-se a importância em investir em técnicas que se assemelhem ao processo fisiológico que ocorre *in vivo*, como por exemplo, o sistema tridimensional de cultivo (3D).

3.4 Sistema de Cultivo Tridimensional (3D)

O sistema de cultivo 3D pode ser realizado por meio de diferentes técnicas, como: matrizes com componentes naturais como: alginato (DORATI et al; 2016), matrizes sintéticas como hidrogel (GREEN; SHIKANOV, 2016) e nanopartículas associadas a levitação magnética (SOUZA et al., 2010). Esta técnica, apresenta como um de seus fatores positivos, a conservação da morfologia pré-existente da célula (BERKHOLTZ, et al., 2006).

O sistema de cultivo 3D possibilita a manutenção da estrutura tridimensional da célula, mantendo a relação célula-célula/ célula-estroma. O método de levitação magnética por nanopartículas, tem como princípio a magnetização das células por meio de nanopartículas formadas por poli-lisinas, átomos de ferro e ouro, resultando na levitação induzida por magnetismo, que não apresenta efeitos tóxicos, não induz resposta inflamatória e não afeta a proliferação celular negativamente, o que ocorre é o oposto, esta matriz apresenta efeitos positivos na proliferação celular e também na síntese protéica favorecendo assim, o desenvolvimento celular (SOUZA et al., 2010).

Visto isso, estudos estão sendo realizados para que o cultivo 3D tenha maior aplicabilidade e que cada vez mais mimetize o processo que acontece *in vivo* e maximize

a produção para que possa ser utilizado em escala comercial (Varago et al., 2008). É em decorrência deste e outros fatores que, a utilização de nanopartículas e a levitação magnética estão sendo operada além das biotécnicas reprodutivas, como em testes para triagem de medicamentos, para modelo de algumas doenças e na regeneração de tecidos corporais (Pankurst et al. 2003).

4 MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1 Local e Obtenção e seleção dos ovócitos

Os ovários foram coletados de vacas em abatedouro-frigorífico no município de Uberlândia-MG e o transporte ocorreu em garrafa térmica com temperatura entre 35°C a 38°C, em um período máximo de quatro horas, até chegar ao seu destino final, no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia.

Imediatamente após a chegada dos ovários, os ovócitos foram obtidos pelo método de aspiração dos folículos ovarianos que apresentavam diâmetro entre 3 a 8 mm, puncionados com o auxílio de uma agulha, calibre 18G acoplada a uma seringa de 10 mL. Posteriormente, o fluido folicular obtido foi depositado em tubos plásticos de 15 mL e deixados em repouso em banho maria (35°C à 38°C) por 10 minutos até a sedimentação. Este sedimento formado foi transferido para placas de Petri, e avaliado sob um microscópio estereoscópico (Olympus Optical®, modelo SZ-40/SZ-ST) para o rastreamento dos ovócitos.

A classificação dos ovócitos foi realizada por um único observador, baseada no método de Leibfried e First (1979) com adaptações, em que os ovócitos foram classificados de acordo com sua morfologia em: Grau I (núcleo e citoplasma homogêneos e com mais de 3 camadas de células do cumulus); Grau II (ovócitos compactos com três ou menos camadas de células do cumulus e ovócito com citoplasma levemente heterogêneo); Grau III (ovócitos parcialmente desnudos, mostrando remoção de células do cumulus em menos de um terço da superfície da zona pelúcida, com citoplasma altamente heterogêneo), degenerados e atrésicos. Os ovócitos classificadas em bons (grau I e II) e ruins (grau III) foram utilizados para maturação, de acordo com cada tratamento. Cada réplica do experimento teve a mesma qualidade e quantidade de ovócitos por tratamento.

4.2 Desenho Experimental

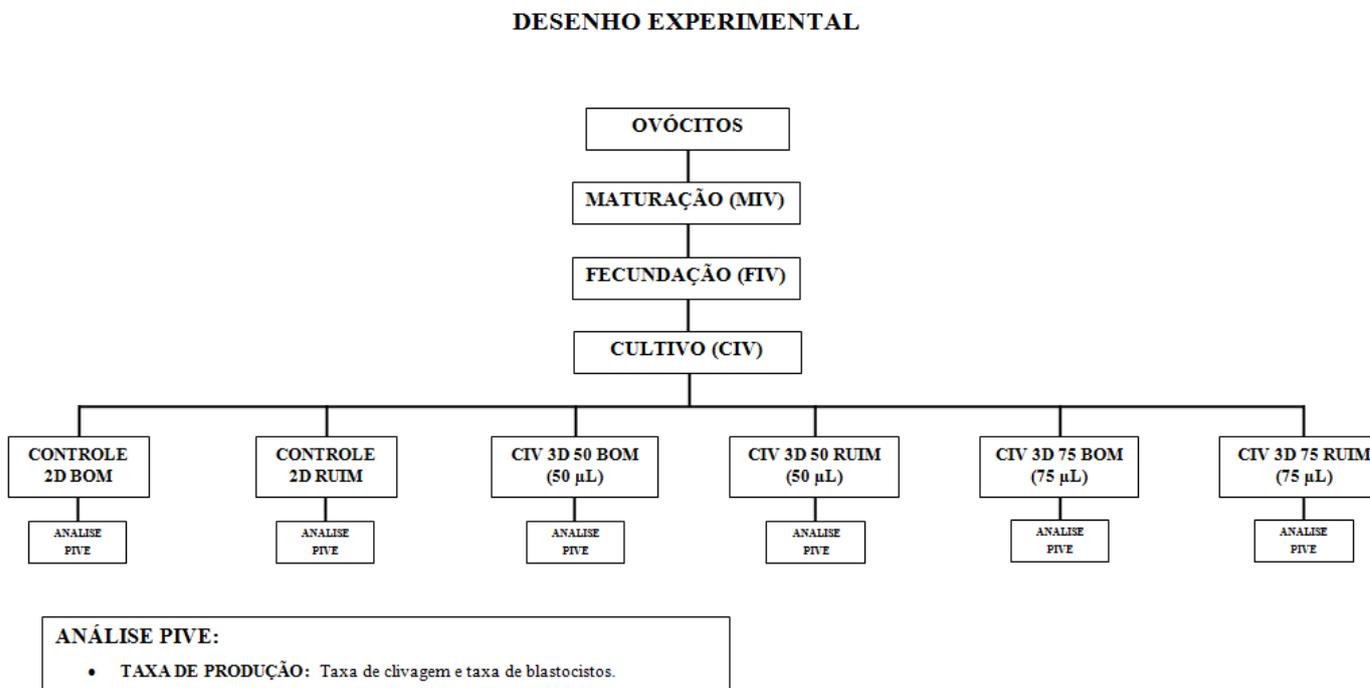


Figura 1. Experimento – Efeito do cultivo *in vitro* tridimensional associado a nanopartículas magnéticas na taxa embrionária de bovinos.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.3 Produção *in vitro* de embriões

Finalizada a seleção, os ovócitos seguiram para a etapa de maturação *in vitro* (MIV), foram lavados duas vezes em meio de lavagem - base TCM-199 Hepes acrescida de 10 % de soro fetal bovino, solução de piruvato (0,11 mg/mL) e amicacina (83 mg/mL). Após este processo, os ovócitos foram lavados uma vez em meio base de maturação constituído de base TCM-199 Bicarbonato acrescida de 10% de soro fetal bovino (0,11 mg/mL), amicacina (83 mg/mL), piruvato de sódio (22 µg/mL), FSH (0,5 µg/mL), LH (5 µg/mL) e seguiram normalmente para a placa de MIV, sendo distribuídos (10 a 15 ovócitos) de acordo com as classificações em ovócitos bons e ovócitos ruins, em gotas do meio de maturação com 100 µL e em seguida incubados em estufa a 38,5°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ durante 22 a 24 horas. Após este período os ovócitos foram

observados em microscópio estereoscópico para avaliação da expansão das células do cumulus, indicando a maturação ovocitária.

Após a maturação os ovócitos foram lavados em duas gotas do meio TALP-FERT acrescido de amicacina (83 mg/mL), solução de piruvato (0,11 mg/mL), PHE (2 μ M penicilamina, 1 μ M hipotaurina, 1 μ M epinefrina), heparina (10 μ g/mL) e albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos essenciais (6 mg/mL), passados para a placa de FIV em gotas de 100 μ L do mesmo meio TALP-FERT seguindo a mesma distribuição da MIV. A fecundação foi realizada com sêmen selecionado do mesmo touro para todas as réplicas. As palhetas de sêmen foram descongeladas e os espermatozoides submetidos ao processo de seleção e capacitação pelo método de centrifugação com gradientes descontínuos de Percoll® adaptado de Parrish et al. (1995), realizado em tubos de 15 mL com 1000 μ L de Percoll 45% e 1000 μ L de Percoll 90%, totalizando assim 2 mL dos gradientes, submetidos a uma rotação durante 30 minutos. Com o fim da preparação, foi avaliado motilidade e vigor, além da concentração por contagem em câmara de Neubauer, com o auxílio de um microscópio de luz e a partir daí foi calculada a quantidade de meio TALP-FERT que foi acrescida no sêmen para que este se encontre na concentração de 25×10^6 de espermatozoides/mL, sendo a dose inseminante utilizada de 4 μ L por gota, considerando assim o dia da FIV como o dia 0 (D0) do desenvolvimento embrionário. A fecundação foi realizada na placa de FIV em gotas contendo meio TALP-FERT. Os COCs juntamente com os espermatozoides foram levados para a estufa por 12 a 18 horas nas mesmas condições da maturação.

Finalizado o período da FIV os possíveis zigotos foram desnudados e lavados em meio com base SOF (Synthetic Oviduct Fluid) suplementado com solução de piruvato (0,11 mg/mL), amicacina (83 mg/mL), BSA livre de ácidos graxos e baixa endotoxina (6 mg/mL) e soro fetal bovino (2,5%) e com o intuito de propiciar a aderência entre provável zigoto e nanopartículas, foram transferidos para microtubos de 200 μ L em grupos de 10, distribuídos em seis tratamentos totais, segundo os tratamentos já pré selecionados na MIV: cultivo dos prováveis zigotos selecionados como ovócitos bons e ruins na MIV em sistema bidimensional tradicional (CIV 2D BOM e CIV 2D RUIM) contendo 100 μ L meio SOF e quatro tratamentos, em que os prováveis zigotos selecionados como ovócitos bons e ruins na MIV foram cultivados em sistema tridimensional por levitação magnética utilizando nanopartículas compostas por ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina

(NanoShuttleTM-PL, n3D, Bioscience, Inc., Houston, TX, USA) nas concentrações de 50 µL/mL (CIV 3D 50 µL BOM e CIV 3D 50 RUIM) e 75 µL/mL (CIV 3D 75 µL BOM e CIV 3D 75 µL RUIM). As nanopartículas foram diluídas em meio SOF nas concentrações de cada tratamento totalizando 100 µL da solução. Os microtubos foram levados para estufa por 12 horas nas mesmas condições da maturação e em seguida os prováveis zigotos pré-cultivados, foram transferidos para placa de 24 poços com 500 µL de meio SOF, sendo o conteúdo de cada microtubo transferido para um poço respeitando cada tratamento, adicionado um drive magnético substituindo a tampa da placa e incubados a 38,5°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ totalizando sete dias. No D3 e D7 foram realizadas análises de produção, utilizando as taxas de clivagem e blastocistos.

4.4 Análises de taxa de produção

Setenta e duas horas após a fecundação (D3) foi avaliada a taxa de clivagem (nº de zigotos clivados/nº de prováveis zigotos que foram para cultivo) e ao final do cultivo (D7) foi estimado a taxa de blastocisto (nº de blastocistos/nº de prováveis zigotos que foram para cultivo), no qual os embriões foram classificados por um único observador, conforme o preconizado pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998). Estas avaliações foram todas realizadas com auxílio do microscópio estereoscópico.

4.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Sigma Plot versão 11.0 (Systat Software Inc, San Jose, California, EUA). Foi realizado o teste qui-quadrado para comparação da porcentagem de clivagem e da produção de blastocistos entre os tratamentos. Os dados foram apresentados na forma de porcentagem com grau de significância $P < 0,05$ indicando diferença.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 812 ovócitos bovinos foram submetidos a produção *in vitro* de embriões em cultivo na presença do drive magnético. Destes, 699 ovócitos posteriormente seguiram para cultivo em um sistema tridimensional (3D) e 113 ovócitos seguiram para cultivo em sistema bidimensional (2D). Todos os tratamentos com diferentes concentrações de nanopartículas apresentaram levitação em contato com a placa magnética (Figura 2). Adicionalmente, não houve contaminação em nenhuma das rotinas realizadas.

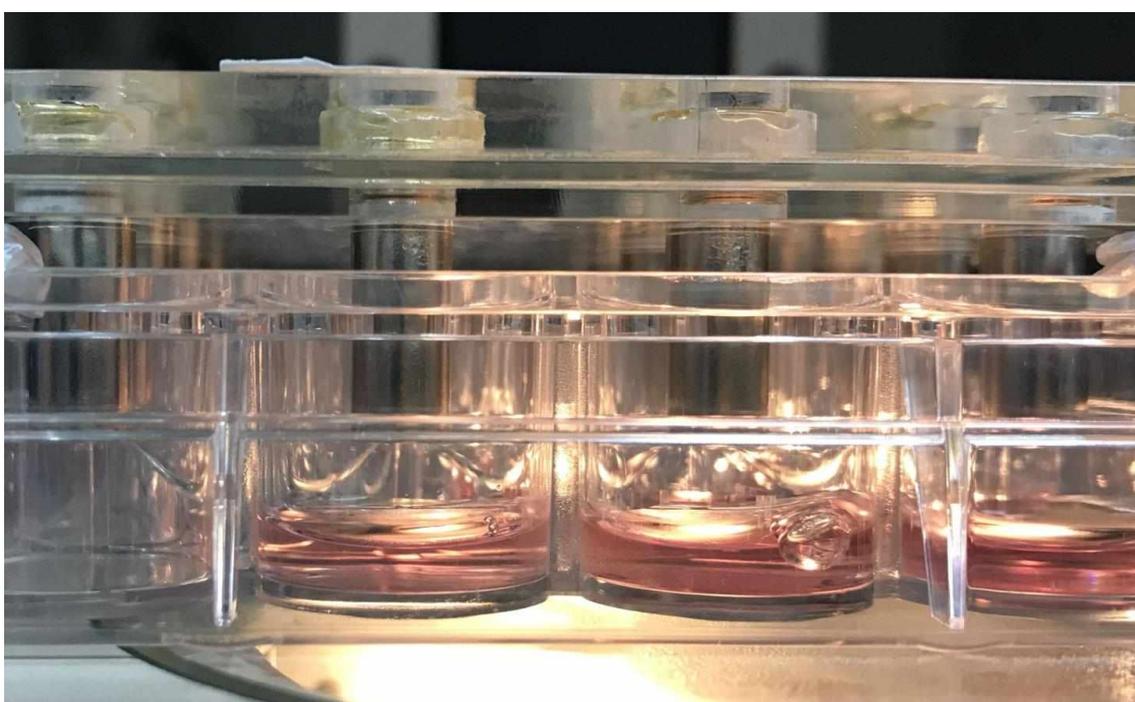


Figura 2. Sistema de cultivo 3D de levitação magnética associado a nanopartículas de ouro, ferro e polo-l-lisina com presença de prováveis zigotos.

Fonte: Arquivo pessoal.

A taxa de clivagem foi maior que 65% em todos os tratamentos, sendo a média de 75%. Além disso, esta taxa foi semelhante ($P > 0,05$) entre os tratamentos de cultivo tridimensional (3D). O tratamento 3D com 50 $\mu\text{L/mL}$ ruim apresentou redução na taxa de clivagem comparado ao sistema bidimensional (2D). Não foi observado produção e estruturas embrionárias em nenhum dos tratamentos de cultivo 2D e 3D de diferentes qualidades e concentrações de nanopartículas com o drive magnético (Tabela 1).

Tabela 1- Percentual da taxa de clivagem e taxa de formação de blastocisto.

TRATAMENTO	% CLIVAGEM	% BLASTOCISTO
CIV 2D BOM	81,7 ^b (67/ 82)	0,0
CIV 2D RUIM	80,0 ^b (56/ 70)	0,0
CIV 3D 50 BOM	77,2 ^{ab} (61/ 79)	0,0
CIV 3D 50 RUIM	65,4 ^a (53/ 81)	0,0
CIV 3D 75 BOM	78,0 ^{ab} (32/ 41)	0,0
CIV 3D 75 RUIM	68,7 ^{ab} (33/ 48)	0,0

*a,b,c Letras diferentes indicam diferença estatística (P < 0,05).

O sistema de cultivo 3D permite que ocorra manutenção da estrutura tridimensional da célula, mantendo a relação célula-célula/ célula-estroma favorecendo o desenvolvimento celular. Visto que mimetiza o ambiente celular natural e recria suas funções nativas, assemelhando-se ao que ocorre *in vivo* (JIN et al., 2010, DESAI et al., 2012).

No sistema de cultivo por levitação, as quais foram levadas ao drive magnético, todas as estruturas levitaram. Para que isso ocorra e apresente desenvolvimento celular similar ao que ocorre *in vivo*, é de suma importância que o cultivo da PIVE ocorra livre de contaminações indesejáveis que culminem em morte ou alteração no desenvolvimento do futuro zigoto (FRESHNEY, R. I.; 1994). Estima-se que 18 a 36% de todos os experimentos empregando linhagens celulares cultivadas têm a credibilidade comprometida por contaminação (NATURE; 2009).

Clivagem é o processo de divisões celulares sucessivas do zigoto até se constituir em blastocisto (Gonçalves et al., 2007). Neste estudo, mesmo utilizando qualidades diferentes de ovócitos, todos os grupos apresentaram taxas de clivagem semelhantes e satisfatórias. Para que isso ocorra, é necessário um ambiente adequado que favoreça esse processo *in vitro*, com meio, tempo, atmosfera e temperatura controlados, sendo propício

temperatura de 39°C com atmosfera controlada (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) e umidade saturada (Gonçalves et al., 2007; Varago et al., 2008).

Não houve produção de blastocistos em nenhum dos tratamentos. Até a diferenciação em blastocisto ocorre uma série de mudanças morfológicas, sendo elas a compactação do blastômeros (mórula compacta) e o desenvolvimento da blastocele (blastocisto inicial). A compactação está envolvida no estabelecimento da polaridade dos blastômeros, indicando uma mudança nos mecanismos homeostáticos disponíveis para o embrião. É caracterizada por um aumento do contato celular entre blastômeros, o qual permanece até o total desaparecimento dos limites celulares individuais por meio de junções de adesão (Watson e Barcroft, 2001).

Após a formação da mórula compacta), as células embrionárias próximas à zona pelúcida (ZP) iniciam a formação de complexos de adesão adicionais, em particular junções tight e estabelecem seus sistemas de transporte de íons em preparação para a formação do blastocisto (Fleming et al., 2000), estágio no qual é caracterizado pela diferenciação de células do trofotoderma, que se localizam externamente e circundam a blastocele, e pela formação da massa celular interna (Gopichandran e Leese, 2003).

Existe a possibilidade de que o campo magnético criado pelo drive magnético possa ter impedido o crescimento celular por alterações biológicas como: desregulação do controle de crescimento e proliferação celular, apoptose, desorganização do citoesqueleto e da morfologia, perda de dependência de ancoragem e inibição por contato (HANAHAHAN, D; WEINBERG, RA, 2011), visto que mesmo os tratamentos que não foram tratados com nanopartículas não apresentaram desenvolvimento de blastocistos. Entretanto faz-se necessário mais estudos sobre os mecanismos moleculares que estariam modulando estes processos. Segundo Chang (2008), a utilização de nanopartículas de ouro utilizadas na radioterapia aumentou a apoptose de células tumorais em camundongos. Contrapondo a este resultado, segundo Antonino e colaboradores (2018) a utilização de nanopartículas na cultura 3D de folículos secundários de bovinos propiciou o desenvolvimento *in vitro* destes com taxas superiores de viabilidade folicular e manutenção do antro além de crescimento regular comparado ao sistema convencional 2D.

6. CONCLUSÃO

O sistema de produção *in vitro* de embriões bovinos em cultivo tridimensional (3D) com presença de nanopartículas magnéticas compostas por ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina não interferiu no processo de clivagem, porém impediu a formação de blastocisto.

REFERÊNCIAS

ANTONINO, D. C. et al. **Cultivo in vitro de folículos pré-antrais bovinos associado à nanopartículas e levitação magnética**, 2017.

ARAÚJO, V. R. et al. **In vitro culture of bovine pre antral follicles: a review. Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 78, 2014.

ASSUMPÇÃO MEOD, HAIPECK K, LIMA AL, MELLO MRB, OLIVEIRA LJ, OLIVEIRA VP, TAVARES LMT, VISITIN JA. **Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros**. Brazil J Vet Res Anim Sci, v.39, p.149-156, 2002.

BERKHOLTZ, CB, LAI, BE WOODRUFF TK & SHEA, LD **Distribution of extracellular matrix proteins type I collagen, type IV collagen, fibronectin, and laminin in mouse folliculogenesis. Histochemistry and Cell Biology** V.126, P.583–592, 2006.

BIGGERS JD, BELL JE, BENOS DJ. **Mammalian blastocyst: transport functions in a developing epithelium**. Am J Physiol, v.255, p.419-432, 1988.

BLONDIN P, BOUSQUET D, TWAGIEAMUNGU H, BARNES F, SIRARD MA. **Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. Biology Reproduction**, v.66, p.38-43, 2002.

CHANG Y. et al., **Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma**. Science 266, 1994.

DADARWAL, D. et al. **Organelle reorganization in bovine oocytes during dominant follicle growth and regression. Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, p. 124, 2015..

DESAI, N., ABDELHAFEZ, F., CALABRO, A., FALCONE, T. **Three dimensional culture of fresh and vitrified mouse pre-antral follicles in a hyaluronan-based hydrogel: a preliminary investigation of a novel biomaterial for in vitro follicle maturation. Reproduction Biology Endocrinol** v.10, p.1–12, 2012.

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.

FLEMING TP, GHASSEMIFAR MR, SHETH B. **Junctional complexes in the early mammalian embryo.** *Semin Reproduction Medicine*, v.18, p.185-193, 2000.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique.** 4. ed. Nova York: Wiley-Liss, 1994.

GONÇALVES PBD, BARRETA MB, SANDRI LR, FERREIRA R, ANTONIAZZI AQ. **Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte.** *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v.31, p.212-217, 2007.

GONÇALVES PBD, FIGUEIREDO JR, FREITAS VJF. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal.** 2. Ed. São Paulo: Roca, 2008, 395p.

GOPICHANDRAN N, LEESE HJ. **Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid.** *Reproduction*, v.126, p.299-308, 2003.

GREEN L, SHIKANOV A, **In vitro culture methods of pre-antral follicles,** *Theriogenology* 2016.04.036.

HANAHAN D, WEINBERG RA. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74

HOME P, RAY S, DUTTA D, BRONSHTEYN I, LARSON M, PAUL S. **GATA3 Is Selectively Expressed in the Trophectoderm of Peri-implantation Embryo and Directly Regulates Cdx2 Gene Expression.** *Biology Chemistry*, v.284, p.28729-28737, 2009.

JIN SY, Lei L, SHEA LD, ZELINSK MB, STOUFFER RL, WOODRUFF TK. **Markers of growth and development in primate primordial follicles are preserved after slow cryopreservation,** *Fertil Steril*, 2010, vol. 93 (pg.2627-2632).

KANKA J. **Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo. Theriogenology**, v.59, p.3- 19, 2003.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. **Factors determining competence of in vitro produced cattle embryos. Theriogenology**, v.51, p.473-485, 1999.

LEQUARRE AS, VIGNERON C, RIBAUCOR F, HOLM P, DONNAY I, BIESTRAN R, CALLENSE H, MERMILLOD P. **Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. Theriogenology**, v.63, p.841-59, 2005.

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

MAPLETOFT, R. J. **History and perspectives on bovine embryo transfer. Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 168-173, 2013.

MEIRELLES, F.V. et al. **Genome activation and developmental block in bovine embryos. Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.13-20, 2004.

MEMILI E, FIRST NL. **Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression compared with others species. Zygote**, v.8, p.87-96, 2000.

NAGAI, T. **The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. Theriogenology**, v.55, p.1291-1301, 2001.

NATURE. **Identity crisis** 457(7232): 935-6; 2009.

PANKHURST et al., **Applications of magnetic nanoparticle in biomedicine**, 2003.

PANGAS SA, SAUDYE H, SHEA LD, WOODRUFF TK. **Novel approach for the three-dimensional culture of granulosa cell–oocyte complexes. Tissue Engineering**, v.9, p.1013-1021, 2003.

SANGILD, P.T., SCHMIDT, M., JACOBSEN, H., et al. **Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from in vitro produced bovine embryos.** *Biology Reproduction.*, v.62, p.1495-1504, 2000.

SOUZA, G. R. **Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation.** *Nature nanotechnology*, v.5, n.4, p.291-296, 2010.

STITZEL ML, J; CHENG KC; SEYDOUX G, **Regulation of MBK-2/ Dyrk kinase by dynamic cortical anchoring during the oocyte-to-zygote transition** *Current Biology*, 2007 .

VARAGO FC, MENCONÇA LF, LAGARES MA. **Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução.** *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v.32, p.100-109, 2008.

WATSON AJ, BARCROFT LC. **Regulation of blastocyst formation**, v.6, p.708-730, 2001.

WATSON AJ, NATALE DR, BARCROFT LC. **Molecular regulation of blastocyst formation**, v.82-83, p.583-592, 2004.

YANG X, JIANG S, FOOTE RH. **Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures.** *Molecular Reproduction Development*, v.34, p.94-100, 1993.

ZUELKE K.A., BRACKETT, B.G.. **Luteinizing hormone enhanced in vitro maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation.** *Biology Reproduction*, v.43, p.784- 787, 1993.