

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

LUISA MIGLIO

CULTIVO *IN VITRO* DE OVÓCITOS BOVINOS UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS E
LEVITAÇÃO MAGNÉTICA

UBERLÂNDIA

2019

LUISA MIGLIO

CULTIVO *IN VITRO* DE OVÓCITOS BOVINOS UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS E
LEVITAÇÃO MAGNÉTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e Estrutural
Aplicadas. Mestrado do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito parcial à obtenção
do título de mestre em Biologia Celular.

Linha da Pesquisa: Biologia da Reprodução

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

UBERLÂNDIA

2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M634 2019	<p>Miglio, Luisa, 1992- Cultivo in vitro de ovócitos bovinos utilizando nanopartículas e levitação magnética [recurso eletrônico] / Luisa Miglio. - 2019.</p> <p>Orientador: Marcelo Emílio Beletti. Coorientadora: Kele Amaral Alves. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2010 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Sociologia. I. Beletti, Marcelo Emílio, 1964-, (Orient.). II. Amaral Alves, Kele, 1975-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.</p> <p>CDU: 316</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural
Aplicadas

Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902

Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br

**ATA**

Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico

Número: 001/2019 do PPGBC

Data: **13 de Fevereiro de 2019**

Discente: **Luisa Miglio**

Matrícula nº 11712BCE003

Título do Trabalho: “**Cultivo *in vitro* de ovócitos bovinos utilizando nanopartículas e levitação magnética**”

Área de concentração: Biologia Celular

Linha de Pesquisa: Biologia da Reprodução

Projeto de Pesquisa vinculado: Maturação *in vitro* de ovócitos bovinos associados à nanopartículas e levitação magnética

DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Às quatorze horas do dia 13 de fevereiro do ano de 2019 no Auditório do Bloco 4K – Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: **Professores Doutores: Cleber Barbosa de Oliveira – IFTM; Alberto da Silva Moraes – UFU e Marcelo Emílio Beletti, orientador** da candidata. Iniciando os trabalhos o presidente da mesa Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti apresentou a Comissão Examinadora e a candidata **Luisa Miglio**, agradeceu a presença do público, e concedeu à discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata **Luisa Miglio** aprovada.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 16:25 horas. Foi lavrada a presente ata que

após lida e conferida, foi assinada pela **Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti UFU/orientador; Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes - UFU; Prof. Dr. Cleber Barbosa de Oliveira – IFTM.



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Emílio Beletti, Professor(a) do Magistério Superior**, em 13/02/2019, às 16:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alberto da Silva Moraes, Membro de Comissão**, em 13/02/2019, às 16:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **CLEBER BARBOSA DE OLIVEIRA, Usuário Externo**, em 13/02/2019, às 16:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0988640** e o código CRC **4BACDED4**.

*Aos meus pais, Isabel e Hércules, e à minha irmã,
Camila Miglio, por me amarem
incondicionalmente.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e meus amigos, de laboratório e da biologia, pela paciência e apoio em todos os momentos da realização do experimento;

Ao Prof. Dr. Marcelo E. Beletti e a Dra. Kele Alves pelos ensinamentos e orientações;

Ao Prof. Dr. Goulart pelo fornecimento de parte do material necessário para o desenvolvimento da pesquisa;

A Amanda Nonato, por auxiliar na execução dos procedimentos experimentais;

Ao frigorífico Luciana por fornecer os ovários;

Ao laboratório de Reprodução Animal pela parceria, em especial a Deize e a Mayara que dedicaram seu tempo e seu conhecimento para que o projeto fosse executado;

Às técnicas Mariani e Rosiane, pelo auxílio na captura das imagens;

E finalmente a CAPES, pelo fornecimento da bolsa de estudos, sem a qual esse mestrado não poderia ter sido finalizado.

Ser feliz não é ter um céu sem tempestade, caminhos sem acidentes, trabalhos sem fadigas, relacionamentos sem decepções.

Ser feliz é encontrar força no perdão, esperança nas batalhas, segurança no palco do medo, amor nos desencontros.

Ser feliz não é apenas valorizar o sorriso, mas refletir sobre a tristeza. Não é apenas comemorar o sucesso, mas aprender lições nos fracassos. Não é apenas ter júbilo nos aplausos, mas encontrar alegria no anonimato.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um “não”. É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Ser feliz é deixar viver a criança livre, alegre e simples que mora dentro de cada um. É ter maturidade para falar “eu errei”. É ter ousadia para dizer “me perdoe”. É ter sensibilidade para expressar “eu preciso de você”. É ter capacidade de dizer “eu te amo”. É ter humildade da receptividade.

Augusto Curi

RESUMO

A utilização da espécie bovina como modelo animal de estudo apresenta grande importância para a produção pecuária brasileira e mundial e mesmo na reprodução assistida humana. A maturação de ovócitos bovinos consiste nos eventos de maturação nuclear e citoplasmática, essenciais para a fecundação e para o desenvolvimento embrionário inicial. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da utilização de nanopartículas associadas à levitação magnética para cultivo tridimensional no processo de maturação *in vitro* de ovócitos bovinos. Mil duzentos e cinquenta e oito ovócitos de qualidades boa e baixa foram selecionados e incubados com e sem nanopartículas e expostos a um drive magnético no período da maturação. O processo de fecundação e cultivo *in vitro* ocorreram de maneira tradicional. As avaliações para análise da maturação citoplasmática ovocitária foram realizadas com auxílio de microscopia Confocal, no qual foram avaliadas morte celular; produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e dispersão dos filamentos de actina, e microscopia eletrônica de transmissão, onde foram mensuradas as áreas ocupadas por mitocôndrias, vacúolos, grânulos corticais e a dispersão de microvilos no espaço perivitelínico. Foi possível observar que o uso das nanopartículas favoreceram a clivagem de ovócitos ruins com maior concentração de nanopartículas, porém a alta concentração de nanopartículas acarretou no aumento de produção de EROS, redução nas áreas ocupadas por mitocôndrias e aumento da área ocupada por vacúolos. Dessa maneira, a utilização das nanopartículas, apesar de apresentar efeito benéfico na clivagem de ovócitos de baixa qualidade, não apresentou um efeito benéfico na maturação citoplasmática dos ovócitos.

ABSTRACT

The use of the bovine species as an animal model of study is of great importance for Brazilian and world livestock production and even for human assisted reproduction. The maturation of bovine oocytes consists of nuclear and cytoplasmic maturation events, essential for fertilization and for early embryonic development. The present work aims to evaluate the effects of the use of nanoparticles associated with magnetic levitation for three - dimensional culture in the process of *in vitro* bovine oocyte maturation. One thousand two hundred and fifty-eight oocytes of good and poor qualities were selected and incubated with and without nanoparticles and exposed to a magnetic drive during the maturation period. The process of *in vitro* fertilization and *in vitro* cultivation occurred in a traditional way. The evaluations were performed with the help of confocal microscopy (cell death; production of reactive oxygen species (ROS) and dispersion of actin filaments) and transmission electronics (areas occupied by mitochondria; vacuoles; cortical granules and dispersion of microvilli in the perivitelline space). It was possible to observe that the use of nanoparticles favored the cleavage of low quality oocytes with higher concentration of nanoparticles, but the high concentration of nanoparticles resulted in increased ROS production, reduction in mitochondrial areas and increase in the area occupied by vacuoles. Thus, the use of nanoparticles, despite having a beneficial effect on the cleavage of low quality oocytes, did not have a beneficial effect on the cytoplasmic maturation of oocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01. Ovócitos bovinos imaturos de boa (A) e de baixa (B) qualidade

Figura 02. Delineamento experimental da distribuição dos grupos testados. 2DB – grupo maturado sem nanopartículas utilizando ovócitos bons; 2DR – grupo maturado sem nanopartículas utilizando ovócitos ruins; 3D-50B – grupo de ovócitos bons maturados utilizando nanopartículas na concentração de 50µL/mL; 3D-50R – grupo de ovócitos ruins maturados utilizando nanopartículas na concentração de 50µL/mL; 3D-75B – grupo de ovócitos bons maturados utilizando nanopartículas na concentração de 75µL/mL; 3D-75R – grupo de ovócitos ruins maturados utilizando nanopartículas na concentração de 50µL/mL

Figura 03. Microscopia confocal de ovócitos bovinos marcados por faloidina mostrando os filamentos de actina marcados em vermelho. **A:** ovócito do grupo 2DB com polimerização dos filamentos de actina bem definida no córtex e distribuição homogênea no interior do citoplasma. **B:** ovócito do grupo 2DR com filamentos de actina bem definida no córtex e distribuição heterogênea no interior do citoplasma. **C, D e E:** ovócitos respectivamente dos grupos 3D-50B, 3D-50R e 3D-75B com polimerização dos filamentos bem definida no córtex e pouca quantidade de polimerização no interior do citoplasma. **F:** ovócito do grupo 3D-75B com polimerização dos filamentos de actina bem definida no córtex e muita quantidade de polimerização no interior do citoplasma. **G e H:** ovócitos do grupo 3D-75R apresentando respectivamente pouca concentração de actina polimerizada (G) e muita concentração no interior do citoplasma (H).

Figura 04. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 2DB indicando grânulos corticais (setas brancas), localizados adjacentes à membrana plasmática, formando clusters e apresentam eletro-densidade homogênea

Figura 05. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 2DB indicando mitocôndrias (setas brancas) em grande quantidade, formando clusters e um corpúsculo polar (CP)

Figura 06. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 2DB indicando vacúolos (setas brancas) localizados próximos à mitocôndrias e de eletro-densidade variada

Figura 07. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 2DR indicando grânulos corticais (setas brancas) localizados adjacentes à membrana plasmática com eletrodensidade heterogênea

Figura 08. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 2DR indicando mitocôndrias (setas pretas) e vacúolos (setas brancas) presentes em grande quantidade formando clusters

Figura 09. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 3D-50B indicando mitocôndrias (cabeça de seta branca) em grandes quantidades; vacúolos (setas brancas) em grande quantidade e formando clusters e grânulos corticais (setas pretas) de densidade variada alinhados junto à membrana

Figura 10. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 3D-50R indicando grânulos corticais (setas brancas) paralelos à membrana plasmática com densidade variada

Figura 11. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 3D-50R indicando mitocôndrias (setas pretas) e vacúolos (setas brancas) com colocalização de ambas as estruturas

Figura 12. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 3D-75B indicando grânulos corticais (setas brancas) presentes em grande quantidade, alinhados à membrana, formando clusters

Figura 13. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 3D-75B indicando mitocôndrias (setas brancas) formando pequenos clusters com pequena quantidade e localizadas de maneira central no citoplasma

Figura 14. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 3D-75B indicando vacúolos (setas brancas) dispersos pelo citoplasma e em grande quantidade

Figura 15. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 3D-75R indicando vacúolos (setas brancas) em grande quantidade formando clusters formados apenas por essas estruturas

Figura 16. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 3D-75R indicando mitocôndrias, em pouca quantidade, tendendo a vacuolização (setas brancas) e grânulos corticais (setas pretas) alinhados à membrana plasmática

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Proporção das taxas de clivagem sobre os ovócitos bovinos fecundados e de produção de blastocistos sobre as taxas de clivagem

Tabela 02. Média da emissão de fluorescência na produção de espécies reativas de oxigênio dos ovócitos após maturação por microscopia confocal utilizando DCF

Tabela 03. Média da espessura dos ovócitos bovinos maturados avaliados em microscopia confocal utilizando marcação de actina por faloidina

Tabela 04. Proporção de ovócitos vivos, mortos e em apoptose após maturação *in vitro*

Tabela 05. Proporção de células vivas, mortas e em processo de apoptose dos embriões após sete dias de cultivo

Tabela 06. Proporção da área ocupada por mitocôndrias, vacúolos e grânulos corticais sobre a área total do citoplasma do ovócito

Tabela 07. Análise visual da dispersão, localização e quantidade aparente de mitocôndrias e microvilos em ovócitos bovinos maturados *in vitro* em sistema de cultivo bidimensional e tridimensional utilizando diferentes concentrações de nanopartículas e levitação magnética

Tabela 08. Análise visual da distribuição, localização e eletro-densidade aparente de vacúolos e grânulos corticais em ovócitos bovinos maturados *in vitro* em sistema de cultivo bidimensional e tridimensional utilizando diferentes concentrações de nanopartículas e levitação magnética

Tabela 09. Matriz de correlação entre as variáveis clivagem; blastocisto; área mitocondrial; área de vacúolos; área de grânulos corticais; produção de EROS

LISTA DE SIGLAS

PIVE – produção *in vitro* de embriões

MIV – maturação *in vitro*

FIV – fertilização *in vitro*

CIV – cultivo *in vitro*

COC – complexo ovócito-cumulus

CGP – célula germinativa primordial

BMP – proteína morfogenética óssea

VG – vesícula germinativa

LH – hormônio luteinizante

FSH – hormônio folículo estimulante

RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro

MPF – fator promotor de maturação

ATP – adenosina trifosfato

Ca²⁺ – íon de cálcio

O₂⁻ – peróxido

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

OH⁻ – hidroxila

EROS – espécies reativas de oxigênio

DNA – ácido desoxirribonucleico

CO₂ – dióxido de carbono

2D – cultivo bidimensional

3D – cultivo tridimensional

2DB – ovócitos de qualidade boa cultivados sem nanopartículas no sistema tradicional bidimensional

2DR – ovócitos de qualidade ruim cultivados sem nanopartículas no sistema tradicional bidimensional

3D-50B – ovócitos de qualidade boa cultivados com nanopartículas na concentração de 50µL/mL no sistema tridimensional

3D-50R – ovócitos de qualidade ruim cultivados com nanopartículas na concentração de 50µL/mL no sistema tridimensional

3D-75B – ovócitos de qualidade boa cultivados com nanopartículas na concentração de 75µL/mL no sistema tridimensional

3D-75R – ovócitos de qualidade ruim cultivados com nanopartículas na concentração de 50µL/mL no sistema tridimensional

Fe₃O₂ – trióxido de ferro

mL – mililitro

µL – microlitro

BSA – albumina sérica bovina

DCF – 2',7'-diclorofluoresceína

PBS – tampão fosfato-salino

SFB – soro fetal bovino

°C – graus Celsius

nm – nanometro

SUMÁRIO

1. Introdução	16
2. Revisão Bibliográfica.....	18
2.1. Ovogênese	18
2.2. Maturação Ovocitária.....	18
2.2.1. Maturação Nuclear	19
2.2.2. Maturação Citoplasmática.....	20
2.3. Cultivo 2D.....	20
2.4. Cultivo 3D.....	21
2.5. Cultivo 3D por Levitação Magnética	21
3. Objetivos	22
3.1. Objetivo Geral.....	22
3.2. Objetivos Específicos.....	22
4. Metodologia	23
4.1. Produção <i>in vitro</i> de Embriões	23
4.1.1. Obtenção e Seleção de Ovócitos	23
4.1.2. Nanopartículas.....	25
4.1.3. Maturação <i>in vitro</i>	25
4.1.4. Fertilização <i>in vitro</i>	26
4.1.5. Cultivo <i>in vitro</i>	27
4.2. Microscopia.....	27
4.2.1. Microscopia Confocal	27
4.2.1.1. Espécies Reativas de Oxigênio	28
4.2.1.2. Microfilamentos de Actina.....	28
4.2.1.3. Apoptose e Morte Celular	28
4.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	29
4.3. Estatística	30
5. Resultados	31
5.1. Produção <i>in vitro</i> de Embriões	31
5.2. Microscopia Confocal	31
5.2.1. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio.....	31
5.2.2. Espessura dos Ovócitos.....	32

5.2.3. Viabilidade Celular	32
5.2.4. Avaliação Visual da Polimerização dos Microfilamentos de Actina	34
5.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	36
5.3.1. Avaliação Quantitativa.....	36
5.3.2. Avaliação Visual da Distribuição das Organelas	37
5.4. Análise de Correlação	52
6. Discussão.....	53
7. Conclusão.....	57
8. Referências Bibliográficas	58

1. Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica utilizada como alternativa para acelerar a reprodução de animais com alto valor genético, sendo dividida em quatro momentos: maturação *in vitro* de ovócitos (MIV); fertilização *in vitro* (FIV); cultivo *in vitro* de embriões (CIV) e inovulação de embriões. É uma ferramenta de pesquisa da biologia e fisiologia do desenvolvimento e é a partir dela que a produção de clones e animais transgênicos é realizada (BERNARDI, 2005). O desenvolvimento desta biotécnica iniciou-se com experimentos em coelhos (LEWIS; GROGORY, 1929; PINCUS; ENZMANN, 1935) e foi aprimorada para outras espécies – camundongos (WHITTEN; BIGGERS, 1968), ratos (TOYODA; CHANG, 1974), humanos (STEPTOE; EDWARDS, 1978) e bovinos (BRACKETT et al., 1982).

A utilização da espécie bovina na produção *in vitro* de embriões (PIVE) ganha destaque nas pesquisas em biotecnologia da reprodução buscando atender as necessidades do campo da produção de carne e leite, setor que apresenta grande importância sócio-econômica no Brasil (BELETTI, 2013). Além do interesse econômico, há também o interesse científico, para as pesquisas básicas e aplicadas.

Os conhecimentos de cada etapa da produção de embriões são essenciais para o seu sucesso. Mesmo com o grande número de pesquisas e o avanço nas metodologias, a produção de blastocisto ainda apresenta um índice de sucesso baixo (30-45%) e o sucesso de implantação de embriões transplantados mais baixo ainda (40-60% dos blastocistos transferidos) (KANE, 2003; RUBIN, 2006).

O sucesso da PIVE está diretamente ligado à qualidade dos ovócitos (SWAIN; POOL, 2008), aos espermatozoides utilizados na fertilização (HANSEN, 2006) e as condições de cultivo *in vitro* (controle do pH, osmolaridade, temperatura e tensão de CO₂) (LONERGAN; FAIR, 2008). Na MIV, primeira etapa da produção que se refere à cultura *in vitro* de ovócitos imaturos, ovócitos provenientes de aspiração *in vivo* ou de ovários oriundos de abatedouros de animais são selecionados e recebem estímulos provenientes do meio no qual estão inseridos para evolução da meiose, envolvendo alterações nucleares e citoplasmáticas essenciais para a fecundação e posterior desenvolvimento embrionário (DADARWAL et al., 2015). Os eventos de maturação nuclear e maturação citoplasmática são distintos, porém interligados. Caso apenas a maturação nuclear ocorra, os ovócitos não serão fecundados ou, em caso de fecundação, não terão capacidade de dar continuidade ao desenvolvimento do embrião (MEIRELLES et al., 2004).

Usualmente, a MIV ocorre em placas de cultivo com a deposição de grupos de complexos ovócito-cumulus (COCs) em microgotas de meio de maturação, nas quais os COCs ficam em contato com a base da placa. Esse sistema de cultivo tradicional, também chamado de bidimensional, não leva em consideração o ambiente natural das células que naturalmente é tridimensional devido à presença da matriz extracelular (HAISLER et al., 2013).

Alternativas ao cultivo tradicional são sistemas de cultivo tridimensional que estão cada vez mais sendo desenvolvidos, testados e aplicados no cultivo celular como uma alternativa de aumentar o desenvolvimento das estruturas cultivadas. Um novo sistema de cultivo tridimensional constituído de nanopartículas formadas por ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina e levitação magnética. Essa metodologia é escolhida por mimetizar o ambiente natural da célula, não afetar a proliferação celular e não induzir resposta inflamatória (SOUZA et al., 2010) e por ter sido utilizada com resultados positivos nas associações entre células, na síntese de matriz extracelular e na manutenção da viabilidade celular (SOUZA et al., 2010; DAQUINAG et al., 2013; HOGAN et al., 2016), além de apresentar trabalhos com efeitos positivos na proliferação celular e síntese proteica (SOUZA et al., 2010; MOLINA et al., 2010).

Dessa maneira, o presente estudo visa avaliar os efeitos da utilização de nanopartículas associadas à levitação magnética no processo de maturação de ovócitos bovinos e seu efeito na produção *in vitro* de embriões.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Ovogênese

O processo de desenvolvimento de células germinativas primordiais (CGP) até o estágio de ovócito haploide fecundado é chamado de ovogênese (RÜSSE, 1983). Esse processo tem início no desenvolvimento embrionário da fêmea, no qual as CGPs migram desde o saco vitelínico até a crista gonadal (PETERS, 1970) devido à ação de fatores como o fator transformador de crescimento β (TGF β) e às proteínas morfogenéticas ósseas -4 (BMP-4), -8b (BMP-8b) e -2 (BMP-2) (YING et al., 2001; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012). Ao alcançarem as cristas gonadais, as CGPs sofrem sucessivas mitoses que dão origem a duas linhagens celulares, uma que realiza redistribuição das organelas sendo chamada de ovogônia (GORDON, 1994) e outra que permanece em interfase e periodicamente divide-se para originar novas células germinativas primordiais que darão origem a novas ovogônias (HIRSHFIELD, 1991).

As ovogônias passam a ser chamadas de ovócitos primários quando realizam a primeira divisão meiótica e interrompem o processo no estágio de diplóteno na prófase I, em que os cromossomos se encontram descompactados e localizados no interior do núcleo, chamado de vesícula germinativa (VG) (PICTON et al., 1998; SMITZ; CORTVRINDT, 2002). Essas células permanecem em diplóteno até que a fêmea alcance a puberdade e, devido à ação do hormônio luteinizante (LH), o ovócito possa retomar a meiose (BETTERIDGE et al., 1989; FIGUEIREDO et al., 2008).

Na puberdade, o pico pré-ovulatório do LH leva ao rompimento da VG e à retomada da meiose, que progride para metáfase I à telófase I resultando na extrusão do primeiro corpúsculo polar e na formação do ovócito secundário, estágio no qual há uma segunda interrupção da meiose (BETTERIDGE et al., 1989). Quando fecundado por um espermatozoide, o ovócito será capaz de finalizar a segunda divisão meiótica e, assim, liberar o segundo corpúsculo polar (MOORE; PERSAUD, 1994).

2.2. Maturação Ovocitária

A evolução do estágio imaturo de um ovócito primário para estágio de maturação completa, próprio para sofrer fecundação e sustentar o desenvolvimento embrionário inicial, é

chamado de competência ovocitária (MINGOTI et al., 2002; SIRARD, 2001). A competência só é alcançada por meio da ação das células do cumulus, responsáveis pela produção de aminoácidos, metabólitos e fatores de crescimento que são transportados para o ovócito por meio de junções comunicantes (GILCHRIST et al., 2008) e pela ação do hormônio folículo estimulante (FSH) que atua nas células do cumulus e estimula a proliferação dessas células, além da síntese de esteroides e expressão de receptores para LH (MARTINS et al., 2008).

A maturação ovocitária ocorre gradualmente e pode ser dividida em: maturação nuclear, caracterizada pela retomada da meiose bloqueada em VG até alcançar o estágio de metáfase II; maturação citoplasmática, em que ocorre a reorganização da distribuição das organelas citoplasmáticas; e maturação molecular, na qual ocorre síntese e armazenamento de proteínas e RNAm (ANGUITA et al., 2008; DODE, 2006; GONÇALVES et al., 2008; SIRARD et al., 2006).

2.2.1. Maturação Nuclear

A maturação nuclear consiste na produção de um gameta haploide pela meiose da célula germinativa, na qual o núcleo sai do estágio de VG e progride para metáfase II. Essa retomada da meiose ocorre *in vivo* devido ao pico de LH (BETTERIDGE et al., 1989) e *in vitro* o start é dado pela retirada do ovócito do interior do folículo (PINCUS; ENZMANN, 1935).

O estágio de VG é caracterizado por um núcleo esférico e pela cromatina descondensada. Interpreta-se que houve o desbloqueio da meiose quando há a condensação cromossômica e a desintegração da membrana nuclear, além da formação da placa metafásica (LANDIM-ALVARENGA; CHOI, 1999). O desbloqueio da meiose é dependente de ativação pelo fator promotor de maturação (MPF – maturation promoting factor), cuja ação está relacionada à dissolução do nucléolo do envoltório nuclear, à condensação cromossômica e à reorganização microtubular (VERDE et al., 1992).

2.2.2. Maturação Citoplasmática

A maturação citoplasmática ocorre simultaneamente à maturação nuclear e consiste em modificações ultraestruturais das organelas que envolvem alterações morfofisiológicas e dispersão pelo ooplasma.

As mitocôndrias exercem papel essencial nos ovócitos, sendo a produção de adenosina trifosfato (ATP), o controle de íons Ca^{2+} , a redução da homeostase e participação na reação em cadeia da apoptose (DUMOLLARD et al., 2007). No estágio imaturo do ovócito as mitocôndrias são, em sua maioria, esféricas e com poucas cristas (READER et al., 2017), além de apresentarem localização periférica. Após a maturação ovocitária, a forma e volume mitocondrial são alterados e prevalecem mitocôndrias no formato de capuz (HYTTEL, 2011) com distribuição por todo o citoplasma (HYTTEL et al., 1986).

A cadeia respiratória mitocondrial, ao produzir ATP, utiliza oxigênio comoceptor final de elétrons que leva a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) – ânions superóxidos (O_2^-); peróxido de hidrogênio (H_2O_2); hidroxilas (OH^-). Esses radicais, em excesso, causam estresse oxidativo nas células, danos no DNA, RNA, proteínas e nas funções mitocondriais (COMPORTI, 1989), inibem a fecundação do ovócito pelo espermatozoide (AITKEN et al., 1993), além de levar à morte celular (GUERIN et al., 2001).

Os grânulos corticais são vesículas de secreção produzidas pelo complexo de Golgi (O'BRIEN et al., 2000). Estão envolvidos no mecanismo de defesa do ovócito que previne a poliespermia a partir da exocitose do seu conteúdo que causa alterações bioquímicas na zona pelúcida (READER et al., 2017). Em ovócitos imaturos, os grânulos são encontrados em clusters e após a maturação ovocitária ficam localizados individualmente próximos à membrana plasmática (CROCOMO et al., 2013; HYTTEL, et al., 1986; LIU, 2011).

2.3. Cultivo 2D

O cultivo bidimensional de ovócitos (2D) é realizado sobre a superfície plástica da placa de cultura. Nesse tipo de sistema os COCs são depositados em microgotas de meio de cultivo sob óleo mineral (ARAÚJO et al., 2014). No entanto, esse método de cultivo pode causar deficiência na performance da fisiologia das células do cumulus (SUOFENG et al.,

2007), pois as células se proliferam e se espalham pela superfície da placa de cultivo que pode prejudicar no estabelecimento de junções do tipo gap entre cumulus e ovócito. A comunicação entre esses dois tipos celulares é importante para que o ovócito alcance a sua competência com sucesso (GREEN; SHIKANOV, 2016).

2.4. Cultivo 3D

O sistema de cultivo tridimensional (3D) foi desenvolvido para tentar recriar um ambiente artificial *in vitro* o mais próximo do ambiente natural *in vivo* das células. O objetivo do cultivo 3D de ovócitos é amenizar a tensão que o COC sofre quando cultivado em sistema bidimensional em contato com o fundo da placa (TELFER; MCLAUGHLIN, 2012). Existem várias metodologias para se cultivar células tridimensionalmente, entre elas existem as matrizes com componentes naturais (alginato, misturas de alginato e fibrina e matrigel) e as matrizes com componentes sintéticos (hidrogel de polietilenoglicol – PEG e nanopartículas) (GREEN; SHIKANOV, 2016).

2.5. Cultivo 3D por Levitação Magnética

O cultivo tridimensional utilizando nanopartículas e levitação magnética foi descrito por Souza et al. (2010). As nanopartículas utilizadas são compostas de ouro (material biocompatível); óxido de ferro (Fe_3O_2) (endógenos ao corpo humano e semelhante aos materiais utilizados em ressonância magnética); e sequências peptídicas de células-adesivas (poli-L-lisina) que se aderem às células (NEUBERGER et al., 2005; SOUZA et al., 2010). A levitação magnética ocorre quando as células aderidas às nanopartículas são expostas a uma placa com ímãs que é colocada sobre a placa de cultivo (SOUZA et al., 2010).

O cultivo tridimensional por levitação magnética utilizando esse tipo de nanopartículas foi utilizado na espécie bovina apenas no cultivo de folículos pré-antrais (ANTONINO et al., 2018), sendo testado pela primeira vez no presente trabalho.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos de diferentes qualidades utilizando sistema tridimensional comparada à maturação no sistema tradicional associadas à produção *in vitro* de embriões.

3.2. Objetivos Específicos

- a.** Avaliar nos diferentes sistemas de cultivo a maturação citoplasmática dos ovócitos com diferentes concentrações de nanopartículas;
- b.** Avaliar o índice de apoptose e morte celular após a maturação ovocitária e no desenvolvimento embrionário inicial;
- c.** Avaliar as taxas de clivagem e de produção de blastocistos;
- d.** Avaliar a emissão de EROS após a maturação ovocitária nos diferentes sistemas de cultivo;
- e.** Avaliar características microscópicas de organelas de ovócitos maturados *in vitro*.

4. Metodologia

4.1. Produção *in vitro* de Embriões

Sete rotinas de produção *in vitro* de embriões foram realizadas, totalizando 1258 ovócitos maturados, 686 ovócitos fecundados e 252 embriões que alcançaram o estágio de blastocisto. Em cada rotina foi utilizado uma dose inseminante de um único touro da raça Nelore adquirido em central de sêmen cuja fertilidade já havia sido comprovada a partir da sua utilização em trabalhos anteriores do grupo e do mesmo protocolo utilizado nesse experimento (LUCIO et al., 2016).

4.1.1. Obtenção e Seleção de Ovócitos

Ovários provenientes de vacas *post mortem* coletados em abatedouro comercial da cidade de Uberlândia foram transportados até o laboratório de biologia da reprodução em garrafa térmica contendo soro fisiológico aquecido a 37°C. Após a chegada ao laboratório, os ovários foram lavados em soro fisiológico e mantidos em banho maria a 37°C enquanto os folículos antrais eram aspirados.

A aspiração dos folículos ocorreu com auxílio de seringa de 10mL e agulha 18G imediatamente após a chega dos ovários ao laboratório. O fluido ovariano foi depositado em tubos de 50mL para a sedimentação das estruturas e o sedimento foi analisado com auxílio de estereoscópio para rastreamento e seleção de complexos ovócitos cumulus (COCs). Foram selecionados ovócitos com diferentes características e classificados em dois grupos distintos bons e ruins.

Ovócitos do grupo bom (Figura 01A) foram aqueles classificados como grau I e grau II de acordo com o que é proposto por Stojkovic et al. (2001), ou seja, ovócitos que apresentavam citoplasma homogêneo, ausência de vacúolos e células do cumulus rodeando todo o ovócito com três ou mais camadas de células. No grupo ruim (Figura 01B) foram selecionados aqueles ovócitos que apresentavam citoplasma heterogêneo com presença de muitos vacúolos e poucas células do cumulus ou ausentes em alguma das faces dos ovócitos. Ovócitos classificados como desnudos e atresícos foram descartados do experimento.

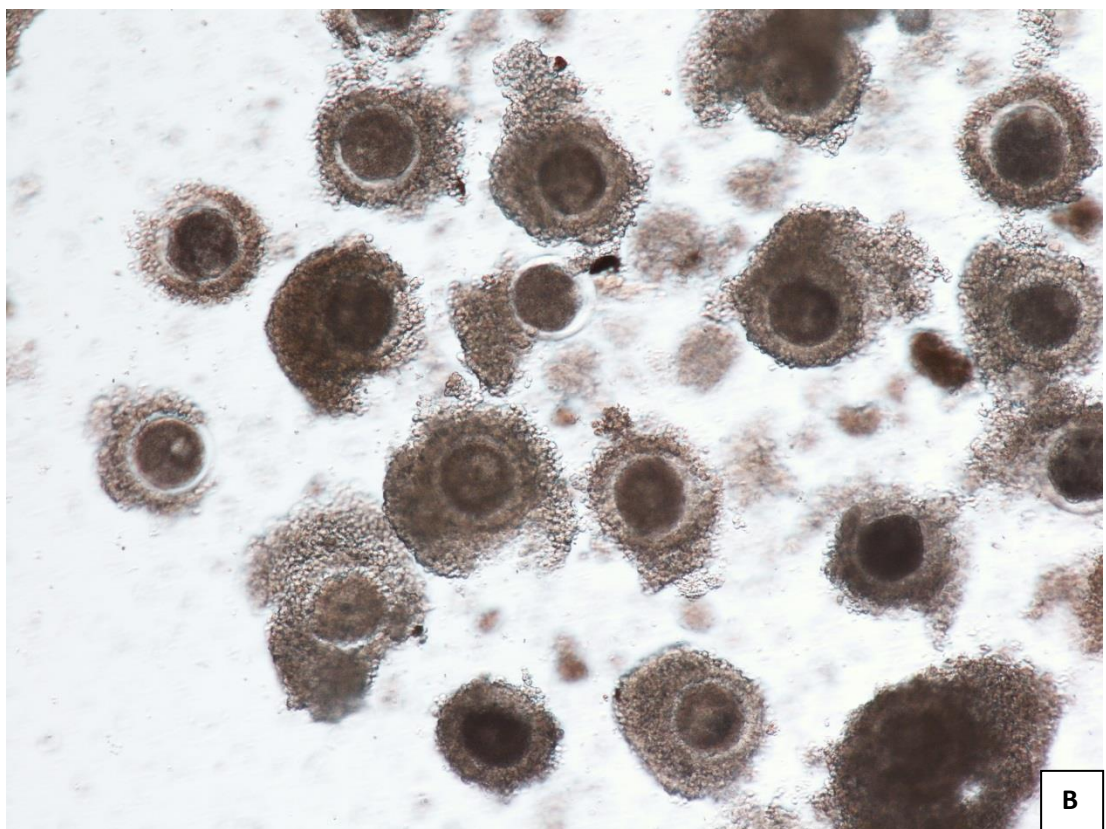
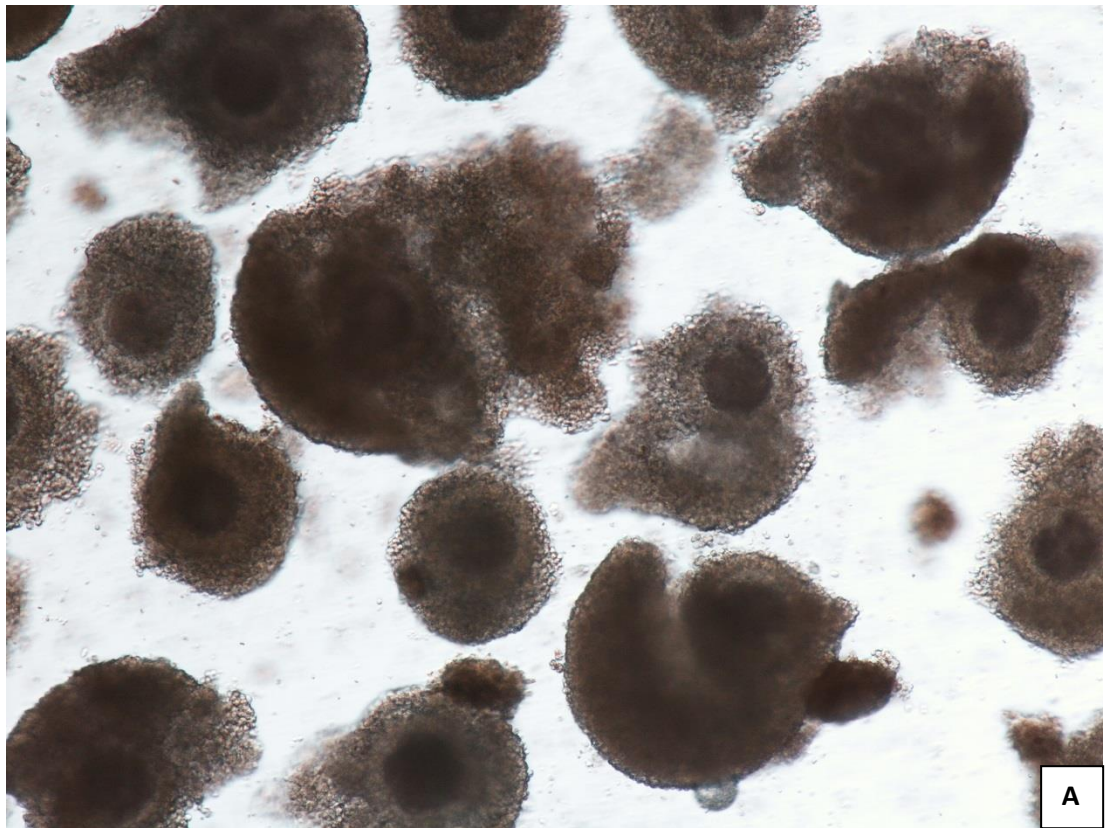


Figura 01. Ovócitos bovinos imaturos de boa (A) e de baixa (B) qualidade

4.1.2. Nanopartículas

As nanopartículas utilizadas no experimento eram compostas de poli-L-lisina, ouro e óxido de ferro e que quando aderidas às células e expostas a um drive magnético permitiam que as estruturas levitassem. As concentrações escolhidas para utilizar no experimento foram: 50µL de nanopartículas/mL de meio (50µL/mL) e 75µL de nanopartículas/mL de meio (75µL/mL), além de um grupo controle sem nanopartículas (Figura 02).

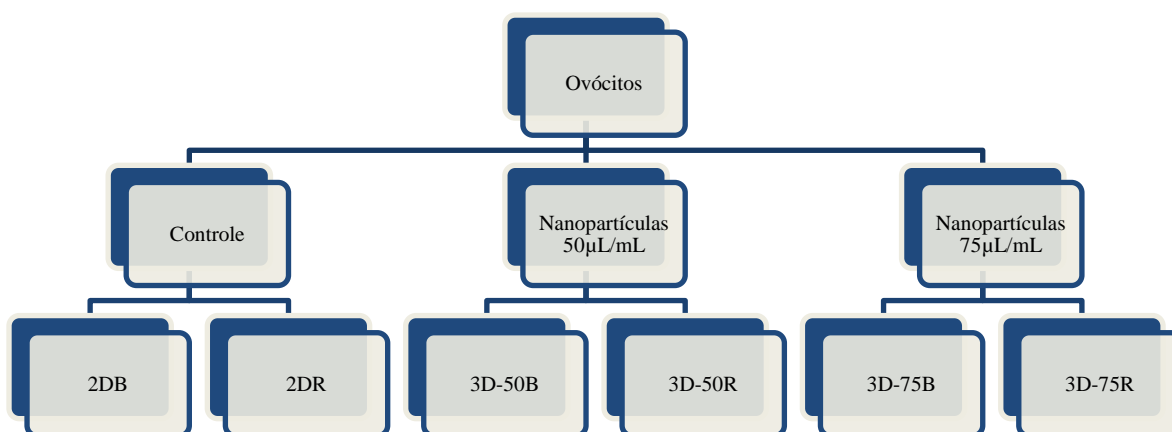


Figura 02. Delineamento experimental da distribuição dos grupos testados. 2DB – grupo maturado sem nanopartículas utilizando ovócitos bons; 2DR – grupo maturado sem nanopartículas utilizando ovócitos ruins; 3D-50B – grupo de ovócitos bons maturados utilizando nanopartículas na concentração de 50µL/mL; 3D-50R – grupo de ovócitos ruins maturados utilizando nanopartículas na concentração de 50µL/mL; 3D-75B – grupo de ovócitos bons maturados utilizando nanopartículas na concentração de 75µL/mL; 3D-75R – grupo de ovócitos ruins maturados utilizando nanopartículas na concentração de 50µL/mL

4.1.3. Maturação *in vitro*

Ovócitos de todos os grupos foram lavados uma vez em meio de lavagem TCM199 HEPES (0,2mM de piruvato sódico, 10mM de HEPES ácido, 10mM de HEPES, 5mM de bicarbonato de sódio, 83µg/mL de amicacina) suplementado com 10% de soro fetal bovino e uma vez em meio de maturação TCM199 com bicarbonato (0,2mM de piruvato sódico, 26mM de bicarbonato de sódio, 83µg/mL de amicacina, 1µg/mL de FSH, 5µg/mL de LH) suplementado com 10% de soro fetal bovino.

Após as lavagens, grupos de 10 COCs foram transferidos para microtubos de 200µL contendo 100µL de meio de maturação e quantidade suficiente de nanopartículas para alcançar as concentrações testadas. A incubação dos ovócitos com as nanopartículas aconteceu por 4 horas em incubadora com temperatura e atmosfera controlada (38°C e CO₂ 5%), em seguida os ovócitos foram transferidos para placa de 24 poços contendo 500µL de meio de maturação, coberta pelo drive magnético e mantida em incubadora por 18 horas.

Ao término do período de maturação metade dos ovócitos foram destinados à fertilização e a outra metade para as análises de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia confocal.

4.1.4. Fertilização *in vitro*

Ovócitos destinados para a FIV foram lavados por três vezes em meio TALP-Fert (base TALP-Fert suplementado com 0,2mM de piruvato sódico, 10,2µM de hipotaurina, 1,97µM de epinefrina, 10µg/mL de heparina, 6mg/mL de BSA e 83µg/mL de amicacina) e transferidos para microgotas de 100µL de meio TALP-Fert cobertas por óleo mineral em placas estéreis de poliestireno 60x15mm.

Uma única dose inseminante de sêmen por réplica foi descongelada em banho maria a 37°C por 30 segundos e o seu conteúdo depositado em microtubo de 1,5mL contendo mini gradiente de Percoll, composto por 400µL de Percoll 90% (Percoll, solução 10x, 1M de CaCl₂, 100mM de MgCl₂, DL-ácido láctico e bicarbonato de sódio) e 400µL de Percoll 45% (200µL de Percoll 90% e 200µL de TALP-Sperm (Base TALP-Sperm acrescido de 0,2mM de piruvato sódico e 83µg/mL de amicacina)). O microtubo foi centrifugado a 3500rpm por 5 minutos, em seguida o sedimento formado foi depositado em outro microtubo contendo 1000µL de meio TALP-Sperm e centrifugado a 3500rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foi acrescido o mesmo volume de meio TALP-Fert. Do volume final 5µL foram utilizados para avaliar motilidade em microscópio de luz utilizando-se lâmina de vidro e 5µL foram diluídos em 95µL de água para avaliação da concentração do número de espermatozoides em microscópio de luz utilizando câmara de Neubauer.

A avaliação do sêmen foi feita de acordo com o manual de exame andrológico (2013) e o cálculo final da dose inseminante foi realizado a partir da fórmula a seguir para que os ovócitos fossem fecundados com a concentração de 1×10^5 espermatozoides por gota.

$$(100/n^{\circ} \text{ de espermatozoides contados}) + (100 - \text{motilidade}) \% = \text{volume } (\mu\text{L}) \text{ da dose}$$

4.1.5. Cultivo *in vitro*

Após 18 horas de incubação dos ovócitos com os espermatozoides, os prováveis zigotos foram desnudados mecanicamente por pipetações consecutivas, lavados por 3 vezes em meio SOF (acrescido de 0,2mM de piruvato sódico, 5mg/mL de BSA, 2,5% de soro fetal bovino e 83µg/mL amicacina) e transferidos para placas de poliestireno 60x15 estéreis, colocados microgotas de 100µL de meio SOF coberto com óleo mineral, onde permaneceram por 6 dias.

Quarenta e oito horas após a fecundação dos ovócitos foram avaliadas as taxas de clivagem por meio de contagem dos zigotos que apresentavam duas ou mais células com o auxílio de estereoscópio. Sete dias após a fecundação foi avaliada a taxa de produção de blastocistos, a partir da contagem da quantidade de embriões que alcançaram esse estágio de desenvolvimento com a utilização de estereoscópio.

4.2. Microscopia

4.2.1. Microscopia Confocal

A microscopia confocal foi utilizada para avaliação da maturação citoplasmática dos ovócitos bovinos após o período de maturação *in vitro*, no qual foram avaliados os seguintes parâmetros: produção de EROS, distribuição citoplasmática dos microfilamentos de actina e apoptose e morte celular. Também foram avaliadas apoptose e morte celular das células de embriões no estágio de blastocisto. Ao total, 360 ovócitos e 241 embriões foram corados com sondas fluorescentes específicas, as imagens foram capturadas no microscópio Zeiss® (LSM 510 meta) e avaliados utilizando o programa Zen 2012®.

As imagens foram adquiridas no aumento de 40 vezes, utilizando lasers de excitação específicos para cada sonda respeitando os seguintes comprimentos de onda: 543nm para

DCF; 633nm para faloidina; 488nm para YOPRO-01 e 543nm para iodeto de propídeo. Os valores de fluorescência de espécies reativas de oxigênio e faloidina foram extraídos pelo programa Zen e a quantidade de células apoptóticas foi contada individualmente.

4.2.1.1. Espécies Reativas de Oxigênio

Para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio, ovócitos coletados após a maturação foram incubados por 30 minutos em microgotas de 100µL formadas por solução de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (492/527) diluído em PBS 1% na concentração de 20µL/mL. Ao término do período de incubação os ovócitos foram lavados em solução PBS 1% acrescido com 2% de SFB e fixados em paraformaldeído 4% por 30 minutos. Posteriormente as estruturas foram transferidas para lâmina de vidro com 10µL de “antifading”, cobertos com lamínula e selados com esmalte.

4.2.1.2. Microfilamentos de Actina

Para a avaliação dos microfilamentos de actina, os ovócitos maturados foram fixados em solução de paraformaldeído 4% por 30 minutos, em seguida foram colocados em solução de Triton 0,1% para permeabilização da membrana por 30 minutos e posteriormente lavados por 3 vezes em solução PBS1% acrescido de 2% de SFB e incubados por 30 minutos em microgotas de 100µL formadas por faloidina 635 (347/633) diluída na concentração de 5µL/mL. Ao término do período de incubação, os ovócitos foram lavados novamente nas mesmas condições anteriores e transferidos para lâmina de vidro com 10µL de “antifading”, cobertos com lamínula e selados com esmalte.

4.2.1.3. Apoptose e Morte Celular

A avaliação das taxas de morte celular de ovócitos maturados e embriões de sete dias foi realizada a partir da incubação por 30 minutos de ambas as estruturas em microgotas de 100µL formadas por 50µL de solução de iodeto de proídeo (493/636) diluído em PBS 1% na concentração de 10µL/mL e por 50µL de solução de YOPRO-01 (491/509) diluído em PBS 1% na concentração de 10µL/mL. Posteriormente as estruturas foram lavadas por 3

vezes em solução PBS 1% acrescido de SFB 2% e fixados por 30 minutos em paraformaldeído 4%. Finalizado o período de fixação, as estruturas foram transferidas para lâminas de vidro com 10µL de “antifading”, cobertos com lamínula e selados com esmalte.

4.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

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

No dia do preparo das amostras, cada microtubo foi submetido à centrifugação a 70g por 5 minutos por três vezes, em que o sobrenadante foi descartado e o volume do microtubo foi recomposto com PBS. Posteriormente foram adicionados 500µL de solução de tetróxido de ósmio a 1% e após 30 minutos foram realizadas três lavagens com PBS para retirada do ósmio. Ao precipitado de células obtido, foi adicionado ágar 3% a 50°C até completar o volume máximo do microtubo para que as células fossem totalmente envolvidas por ele. Posteriormente os microtubos foram mantidos a 4°C até a solidificação do ágar.

O material incluído em ágar foi retirado do microtubo e partido em fragmentos de 1mm³. Os fragmentos foram colocados em frascos de vidro de 5mL e desidratados por 5 minutos em banhos com solução de concentrações crescentes de álcool (50%, 70%, 80%, 90% e 95%) e em seguida, três banhos de 10 minutos em álcool 100% e três banhos de 10 minutos de óxido de propileno 100%. Após os banhos, foi adicionada às amostras solução de resina Epon EMS (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, UK) diluída em óxido de propileno na proporção 2:1 e incubadas por 12 horas (overnight). Em seguida, a solução 2:1 foi descartada e substituída por solução na concentração de 1:1 de óxido de propileno e resina e mantidas por 12 horas em temperatura ambiente e, posteriormente, 12 horas em estufa 37°C com os frascos abertos. Após esta etapa, a solução de óxido de propileno e resina Epon foi descartada e adicionou-se solução de resina pura suficiente para cobrir toda a amostra e os vidros foram colocados de volta na estufa 37°C inclinados 45° por 3 horas. A resina foi novamente retirada e o material foi transferido para formas, em que as

amostras eram cobertas por resina Epon pura até completar os orifícios e as formas foram mantidas em estufa à temperatura de 60°C por 72 horas.

Após a polimerização da resina, os blocos foram retirados das formas, desbastados e, então o material foi cortado com ultramicrotomo Reichert-Jung (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA). Os cortes entre 60 e 90nm de espessura foram colocados em telas de cobre (Mesh Square 200 lines/inch, Electron Microscopy Sciences) e contrastados em acetato de uranila (3%) e citrato de chumbo (1%) conforme descrito por Bozzola e Russel (1998). Os cortes foram analisados em microscópio eletrônico de transmissão (Hitachi HT 7700) e as imagens foram capturadas nos aumentos de 8 a 30 mil vezes. As estruturas fotografadas foram mensuradas com o auxílio do programa Image J (National Institutes of Health, USA). As áreas das mitocôndrias, vacúolos e grânulos corticais foram medidas e comparadas com a área total do ovócito; também foi feita uma avaliação de distribuição de cada estrutura a partir da observação visual das imagens obtidas no microscópio eletrônico de transmissão.

Além da mensuração das áreas das estruturas já citadas, imagens capturadas no aumento de 20.000x foram utilizadas para se realizar uma análise visual ultraestrutural do ovócito. Observou-se a dispersão e localização das mitocôndrias; dispersão, localização e eletrodensidade de grânulos corticais e vacúolos e dispersão das microvilosidades.

4.3. Estatística

Os dados quantitativos foram inicialmente avaliados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se a distribuição dos dados era normal. Uma vez isso confirmado, foi realizado o teste anova e como teste “post hoc”, o teste t de Student. Também foi realizado o teste de correlação de Pearson entre as variáveis quantitativas. Todos os testes foram realizados utilizando o software Excel/Action®.

5. Resultados

5.1. Produção *in vitro* de Embriões

Um total de 686 ovócitos foram fecundados e cultivados, 523 zigotos apresentaram primeira clivagem e 252 embriões alcançaram o estágio de blastocisto ao sétimo dia de cultivo *in vitro*. As taxas de clivagem e de blastocistos estão demonstradas (tabela 01). As nanopartículas não alteraram a taxa de clivagem dos grupos de ovócitos bons, mas parecem ter melhorado o desempenho do grupo de ovócitos ruins na concentração de 75µL/mL. Já a formação de blastocistos teve piora nos grupos de ovócitos bons e nenhuma alteração no grupo de ovócitos ruins

Tabela 01. Proporção das taxas de clivagem sobre os ovócitos bovinos fecundados e de produção de blastocistos sobre as taxas de clivagem

TRATAMENTO	CLIVAGEM (%) (clivados/fecundados)	BLASTOCISTOS (%) (blastocistos/clivados)
2DB	83,24 ^{AB} ± 8,77	61,13 ^A ± 20,38
2DR	63,72 ^C ± 7,94	39,43 ^B ± 8,12
3D-50B	79,20 ^{ABD} ± 9,00	44,12 ^B ± 17,77
3D-50R	65,68 ^{CDE} ± 15,81	36,88 ^B ± 17,10
3D-75B	86,26 ^A ± 7,59	57,95 ^A ± 9,26
3D-75R	76,78 ^{BE} ± 9,55	41,28 ^B ± 10,84

^{A,B,C,D,E} Letras distintas na mesma coluna diferem entre si (p < 0,05).

5.2. Microscopia Confocal

5.2.1. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

Na Tabela 2 estão expostas as avaliações da produção de espécies reativas de oxigênio de ovócitos bovinos maturados através da utilização de DCF observados em microscópio confocal. A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) foi inferior (P < 0,05) nos grupos 2DB e 3D-50B. Em contrapartida, tanto os grupos de ovócitos ruins cultivados em sistema 3D ou 2D como os bons cultivados com 75µL/mL apresentaram taxas de ROS semelhantes entre si (P > 0,05).

Tabela 02. Média da emissão de fluorescência na produção de espécies reativas de oxigênio dos ovócitos após maturação por microscopia confocal utilizando DCF

TRATAMENTO	EROS
2DB	39,45 ^A ± 24,94
2DR	64,65 ^B ± 33,05
3D-50B	59,75 ^A ± 48,49
3D-50R	88,00 ^B ± 50,08
3D-75B	57,74 ^B ± 36,68
3D-75R	65,84 ^B ± 35,62

^{A,B} Letras distintas na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$).

5.2.2. Espessura dos Ovócitos

Na Tabela 3 estão expostas as avaliações da espessura dos ovócitos medida por marcação de actina utilizando faloidina com o intuito de observar o efeito da metodologia tridimensional na ocupação espacial dos mesmos. Os valores de espessura dos ovócitos não diferiram estatisticamente entre todos os grupos avaliados.

Tabela 03. Média da espessura dos ovócitos bovinos maturados avaliados em microscopia confocal utilizando marcação de actina por faloidina

TRATAMENTO	Espessura de Ovócitos (µm)
2DB	50,33 ± 40,12
2DR	29,50 ± 15,29
3D-50B	40,82 ± 24,66
3D-50R	49,61 ± 36,36
3D-75B	30,76 ± 21,27
3D-75R	38,76 ± 27,50

5.2.3. Viabilidade Celular

As taxas de ovócitos mortos e em processo de apoptose estão expressas (Tabela 04). De uma maneira geral, todos os tratamentos apresentaram altas proporções de viabilidade

ovocitária (>88%) e baixas taxas de apoptose (< 4%). Além disso, as proporções de ovócitos vivos ou em apoptose foram semelhantes ($P>0,05$) em todos os grupos avaliados.

Tabela 04. Proporção de ovócitos vivos, mortos e em apoptose após maturação *in vitro*

TRATAMENTO	Ovócitos Vivos	Ovócitos Mortos	Ovócitos em Apoptose
2DB	90,00% (27/30)	10,00% (3/30)	0,00% (0/30)
2DR	89,29% (25/28)	7,14% (2/28)	3,57% (1/28)
3D-50B	87,50% (21/24)	8,33% (2/24)	4,17% (1/24)
3D-50R	100% (29/29)	0,00% (0/29)	0,00% (0/29)
3D-75B	95,83% (23/24)	4,17% (1/24)	0,00% (0/24)
3D-75R	90,00% (27/30)	6,67% (2/27)	3,33% (1/30)

Na Tabela 5, estão apresentadas as proporções de células vivas, mortas e em processo de apoptose dos embriões após sete dias de cultivo. A proporção de células vivas foi superior a 96% em todos os tratamentos. Em contrapartida, os índices de células em apoptose não ultrapassaram 3% do total de células avaliadas.

Tabela 05. Proporção de células vivas, mortas e em processo de apoptose dos embriões após sete dias de cultivo

TRATAMENTO	Células Vivas	Células Mortas	Células em Apoptose
2DB	97,86% (3347/3421)	0,14% (5/3421)	2,00% (69/3421)
2DR	96,98% (2305/2360)	1,10% (26/2360)	1,92% (26/2360)
3D-50B	98,45% (3170/3230)	0,31% (10/3230)	1,24% (50/3230)
3D-50R	96,02% (1874/1923)	0,88% (17/1923)	3,10% (32/1923)
3D-75B	99,27% (4367/4390)	0,07% (3/4390)	0,66% (20/4390)
3D-75R	98,40% (2504/2547)	0,51% (13/2547)	1,09% (31/2547)

5.2.4. Avaliação Visual da Polimerização dos Microfilamentos de Actina

Os microfilamentos de actina tendem a se acumular na região cortical do ovócito após o desbloqueio da VG até a finalização da maturação ovocitária. Foi possível observar que todos os grupos apresentaram boa polimerização de actina no córtex ovocitário, mas no interior do citoplasma variou bastante a quantidade dos polímeros, principalmente nos ovócitos maturados na concentração de 75 μ L/mL por haver diversos padrões de polimerização dentro do grupo.

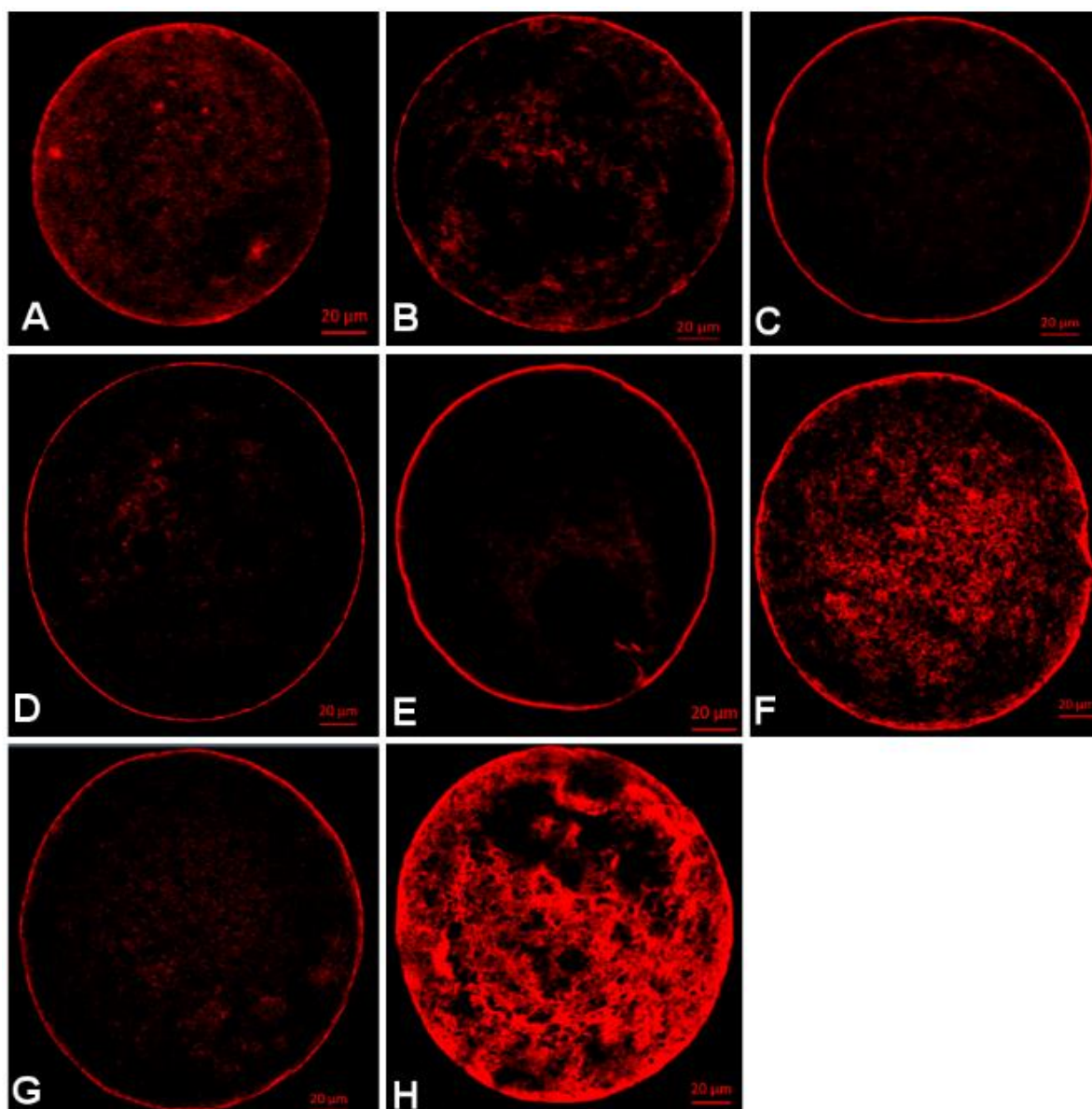


Figura 03. Microscopia confocal de ovócitos bovinos marcados por faloidina mostrando os filamentos de actina marcados em vermelho. **A:** ovócito do grupo 2DB com polimerização dos filamentos de actina bem definida no córtex e distribuição homogênea no interior do citoplasma. **B:** ovócito do grupo 2DR com filamentos de actina bem definida no córtex e distribuição heterogênea no interior do citoplasma. **C, D e E:** ovócitos respectivamente dos grupos 3D-50B, 3D-50R e 3D-75B com polimerização dos filamentos bem definida no córtex e pouca quantidade de polimerização no interior do citoplasma. **F:** ovócito do grupo 3D-75B com polimerização dos filamentos de actina bem definida no córtex e muita quantidade de polimerização no interior do citoplasma. **G e H:** ovócitos do grupo 3D-75R apresentando respectivamente pouca concentração de actina polimerizada (G) e muita concentração no interior do citoplasma (H)

5.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão

5.3.1. Avaliação Quantitativa

Para a avaliação de mitocôndrias, vacúolos e grânulos corticais foi utilizada microscopia eletrônica de transmissão, onde foram mensuradas as áreas ocupadas por essas estruturas no citoplasma dos ovócitos nos diferentes tratamentos após a maturação *in vitro* (Tabela 06). Nos grupos de ovócitos 2DB e 3D-50B a proporção de área ocupada por mitocôndrias foi superior aos grupos 2DR e 3D-75B e 3D-75R. Adicionalmente, essa proporção foi semelhante entre os grupos 3D-50B e 3D-50R e entre todos os grupos de ovócitos ruins.

Ao se observar as proporções de áreas ocupadas por vacúolos, os grupos 2DB, 3D-50B e 3D-50R apresentaram as menores áreas ($P < 0,05$) ocupadas por essas estruturas e foram semelhantes entre si ($P > 0,05$). Já os grupos 2DR, 3D-75B e 3D-75R apresentaram proporções de área ocupada por vacúolos semelhantes ($P > 0,05$). Os grupos 2DB, 2DR e 3D-75B apresentaram as maiores proporções de área ocupadas por grânulos corticais. Ao se comparar a mesma concentração de nanopartículas utilizadas na maturação, o grupo de 3D-75R foi inferior ($P < 0,05$) ao 3D-75B.

Tabela 06. Proporção da área ocupada por mitocôndrias, vacúolos e grânulos corticais sobre a área total do citoplasma do ovócito

TRATAMENTO	Mitocôndria % (área/área)	Vacúolo % (área/área)	Grânulos corticais % (área/área)
2DB	11,06 ^A ± 0,70	7,59 ^A ± 1,07	0,64 ^{ABC} ± 0,32
2DR	8,64 ^B ± 2,67	14,74 ^B ± 3,86	0,79 ^A ± 0,33
3D-50B	10,43 ^{AD} ± 1,76	9,38 ^A ± 3,93	0,51 ^{BC} ± 0,20
3D-50R	8,73 ^{BD} ± 3,10	9,21 ^A ± 3,96	0,96 ^{AC} ± 0,72
3D-75B	6,48 ^C ± 2,24	13,98 ^B ± 7,24	1,48 ^A ± 2,00
3D-75R	6,45 ^{BC} ± 2,71	18,26 ^B ± 5,87	0,39 ^B ± 0,10

^{A,B,C} Letras distintas na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$).

5.3.2. Avaliação Visual da Distribuição das Organelas

A análise visual ultraestrutural dos ovócitos está sintetizada nas tabelas 07 e 08, onde se comparou os tratamentos através da observação: a dispersão e localização das mitocôndrias; dispersão, localização e eletro-densidade de grânulos corticais e vacúolos e dispersão das microvilosidades.

Tabela 07. Análise visual da dispersão, localização e quantidade aparente de mitocôndrias e microvilos em ovócitos bovinos maturados *in vitro* em sistema de cultivo bidimensional e tridimensional utilizando diferentes concentrações de nanopartículas e levitação magnética

Tratamento	Mitocôndrias	Microvilosidades
2DB	Grande quantidade (Figura 04) Formam clusters	Irregulares Baixa densidade Dispersos preenchendo quase todo o espaço perivitelínico
2DR	Pouca quantidade (Figura 08)	Pouca quantidade Dispersos Distribuídos de maneira irregular.
3D-50B	Grande quantidade (Figura 09)	Microvilos escassos Distribuição heterogênea na superfície.
3D-50R	Pouca quantidade (Figura 11) Em algumas áreas as mitocôndrias encontram-se próximas aos vacúolos	Pouca quantidade Distribuição heterogênea
3D-75B	Pouca quantidade (Figura 13) Formam pequenos clusters Centralizadas	Distribuição heterogênea
3D-75R	Pouca quantidade (Figura 16)	De baixa altura Pouca quantidade Distribuição homogênea

Tabela 08. Análise visual da distribuição, localização e eletro-densidade aparente de vacúolos e grânulos corticais em ovócitos bovinos maturados *in vitro* em sistema de cultivo bidimensional e tridimensional utilizando diferentes concentrações de nanopartículas e levitação magnética

Tratamento	Grânulos Corticais	Vacúolos
2DB	Grande quantidade (Figura 04) Localizados adjacentes à membrana Formam clusters Eletrondensidade homogênea	Encontrados associados às mitocôndrias (Figura 06) Formam clusters Eletro-densidade variada
2DR	Localizados alinhados próximos à membrana (Figura 07) Apresentam eletro-densidades heterogêneas	Formam clusters (Figura 08) Grande quantidade
3D-50B	Densidade variada (Figura 09) Alinhados junto à membrana Pouca quantidade Não formam clusters	Grande quantidade (Figura 09) Formam clusters
3D-50R	Densidade variada (Figura 10) Formam clusters paralelos à superfície. Pouca quantidade	Dispersos (Figura 11) Grande quantidade
3D-75B	Grande quantidade (Figura 12) Clusters alinhados à membrana Distribuição heterogênea.	Dispersos (Figura 14) Grande quantidade
3D-75R	Alinhados à membrana (Figura 16) Pouca quantidade Não formam clusters	Apresenta clusters formados apenas por vacúolos (Figura 15) Grande Quantidade

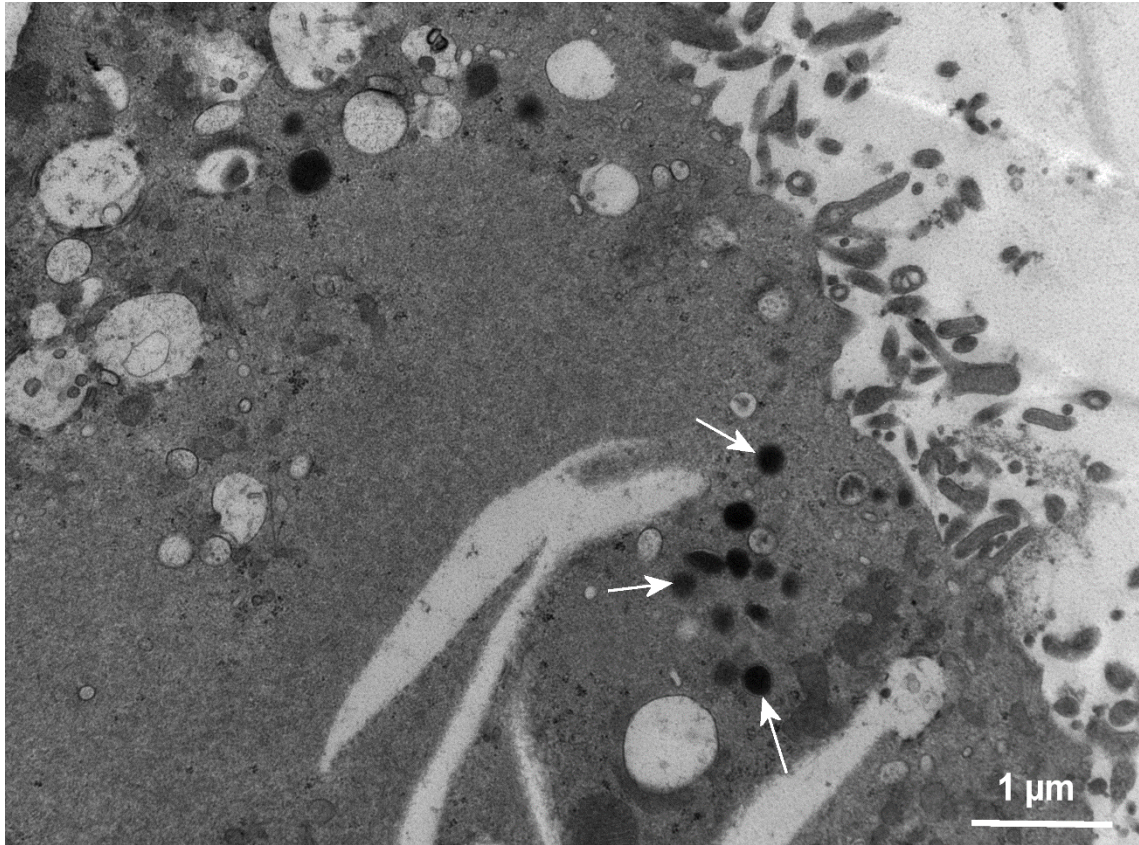


Figura 04. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 2DB indicando grânulos corticais (setas brancas), localizados adjacentes à membrana plasmática, formando clusters e apresentam eletro-densidade homogênea

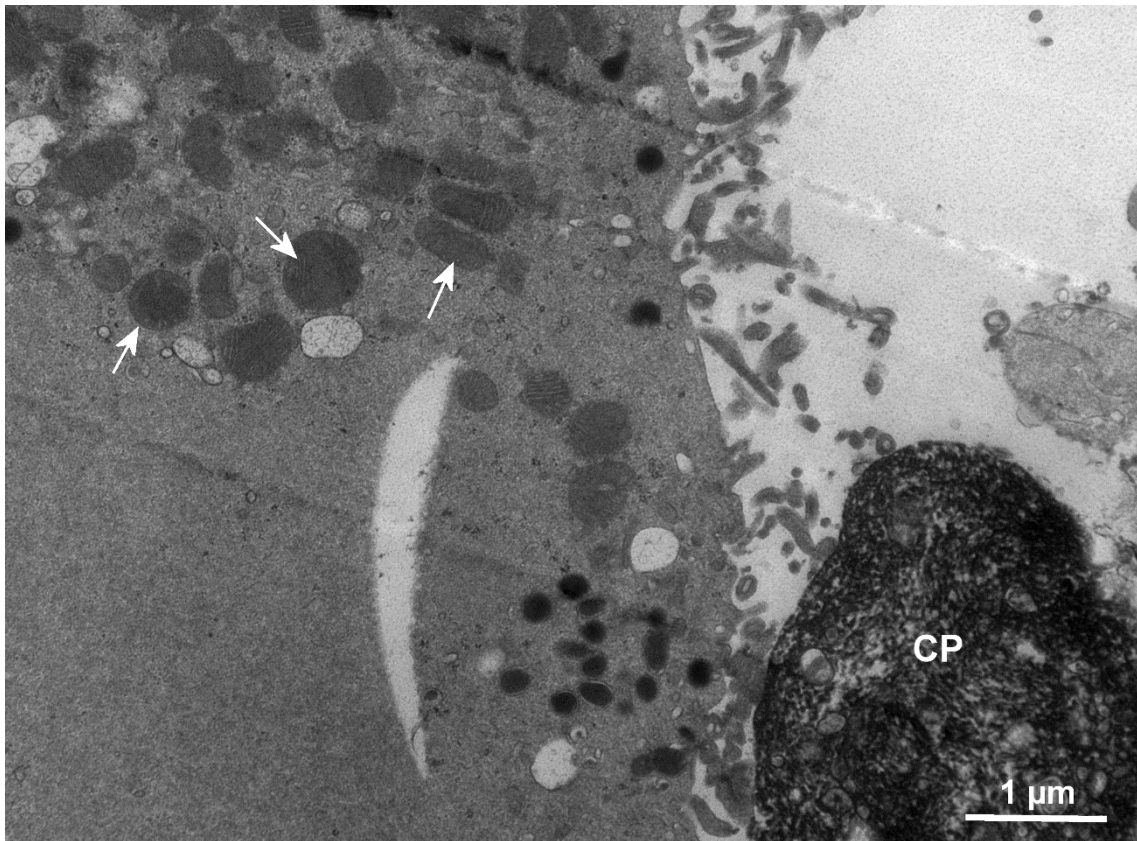


Figura 05. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 2DB indicando mitocôndrias (setas brancas) em grande quantidade, formando clusters e um corpúsculo polar (CP)

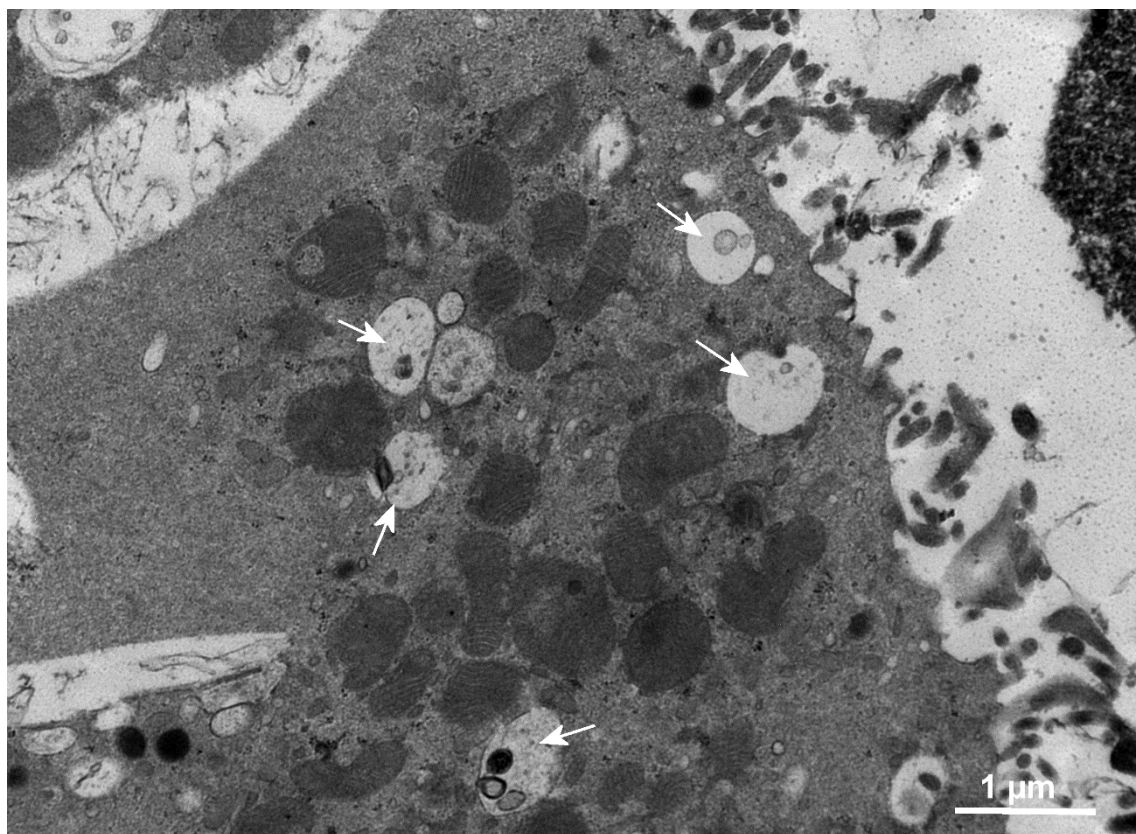


Figura 06. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 2DB indicando vacúolos (setas brancas) localizados próximos à mitocôndrias e de eletro-densidade variada

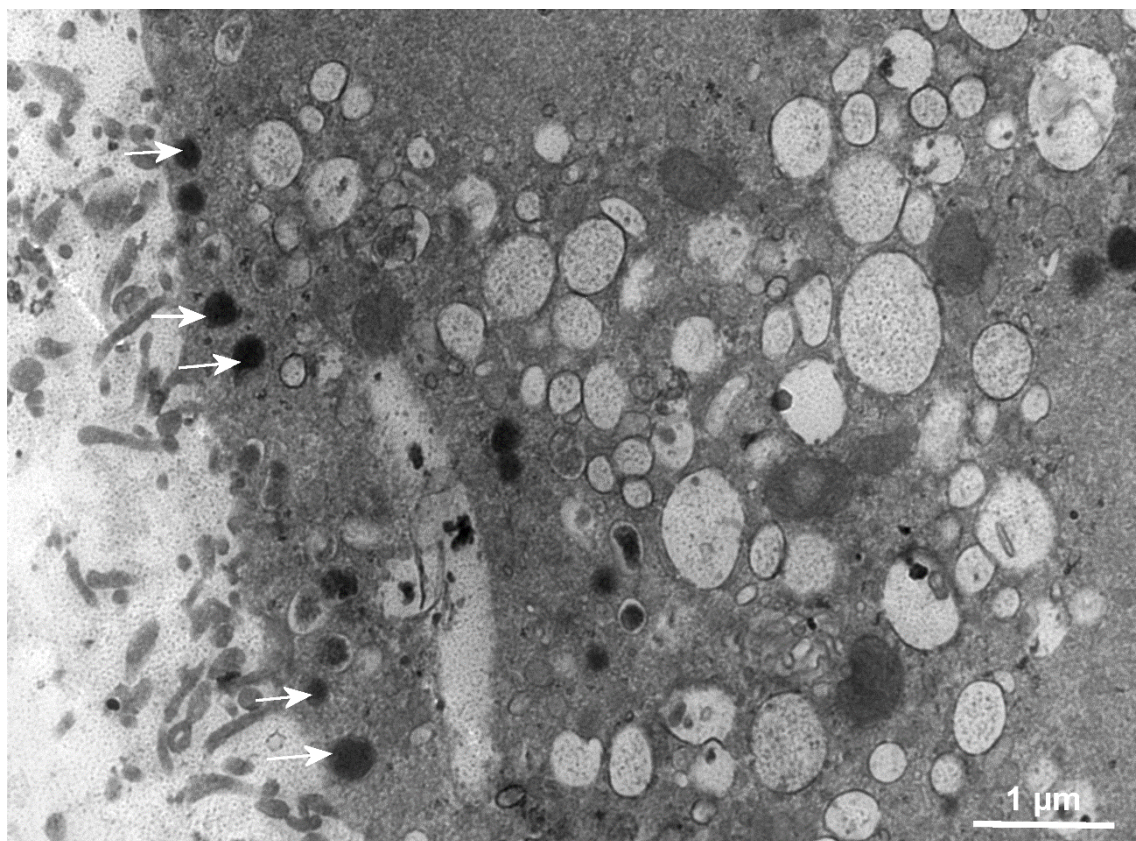


Figura 07. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 2DR indicando grânulos corticais (setas brancas) localizados adjacentes à membrana plasmática com eletro-densidade heterogênea

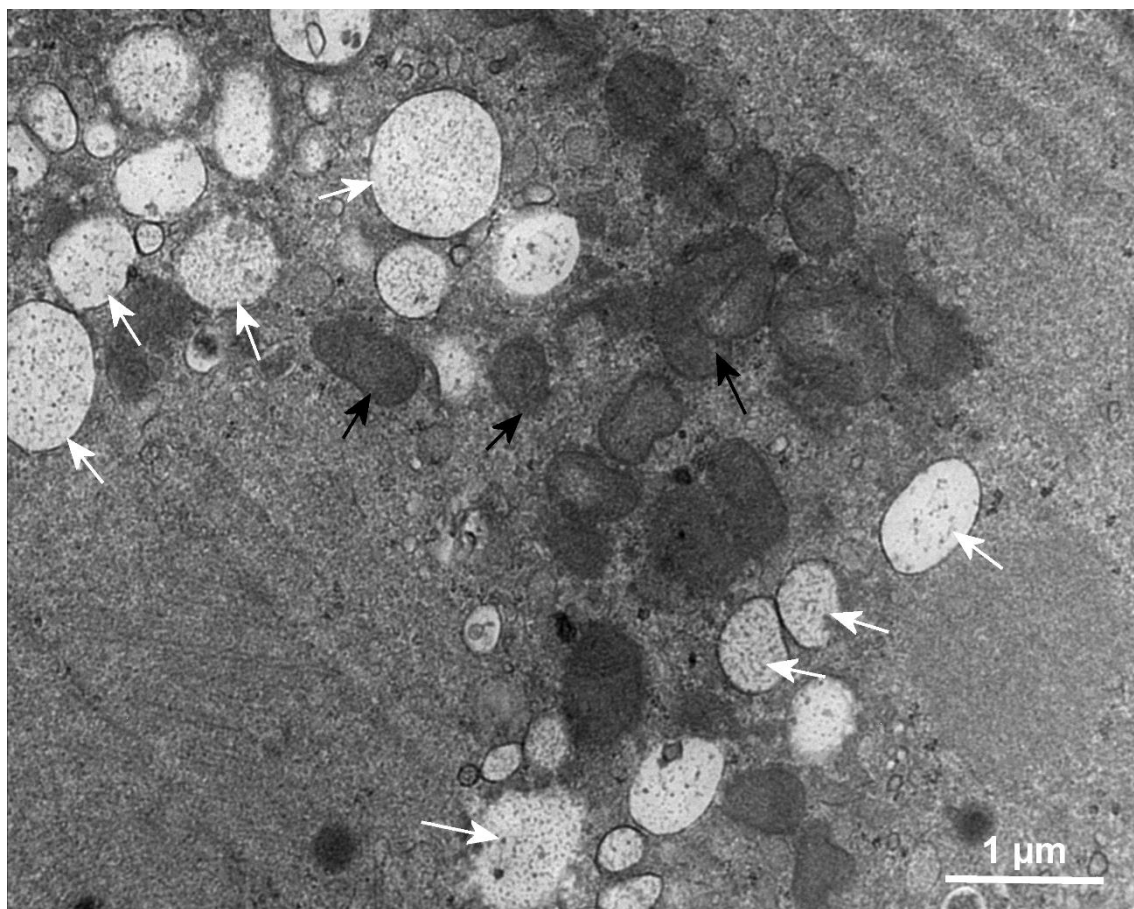


Figura 08. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 2DR indicando mitocôndrias (setas pretas) e vacúolos (setas brancas) presentes em grande quantidade formando clusters

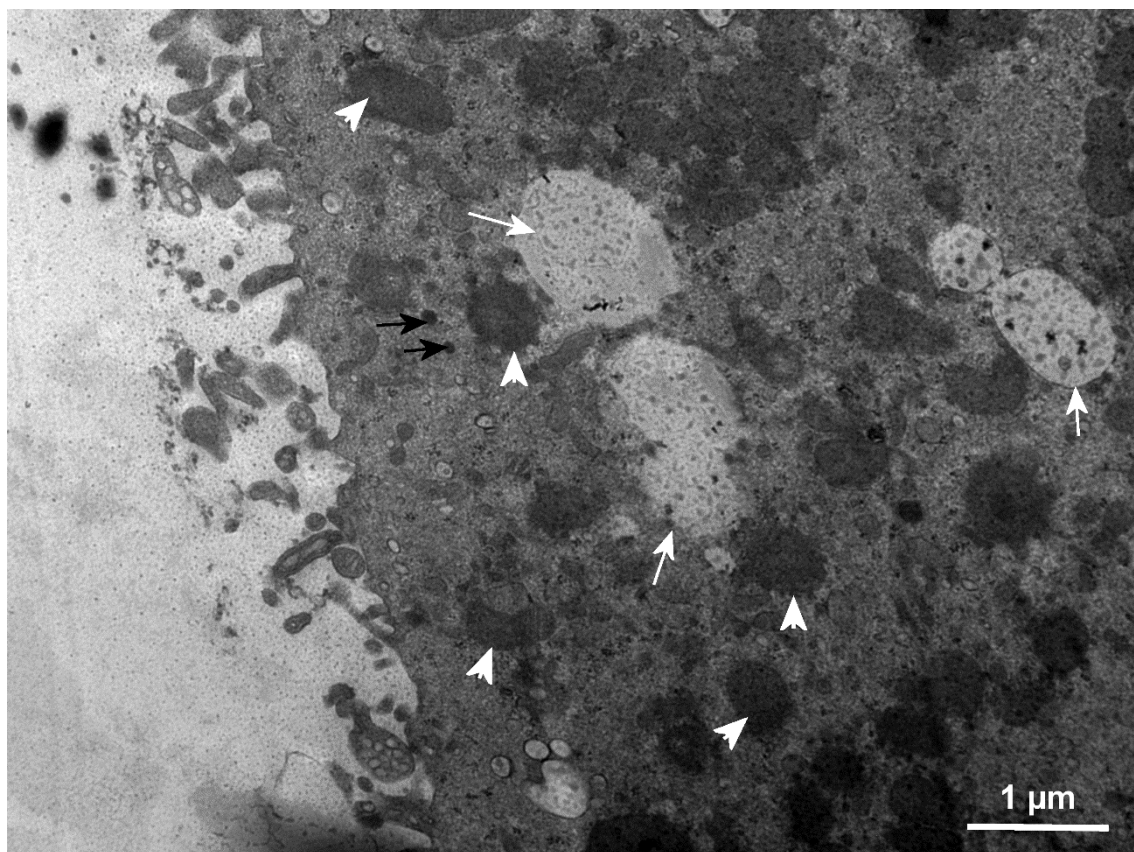


Figura 09. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 3D-50B indicando mitocôndrias (cabeça de seta branca) em grandes quantidades; vacúolos (setas brancas) em grande quantidade e formando clusters e grânulos corticais (setas pretas) de densidade variada alinhados junto à membrana

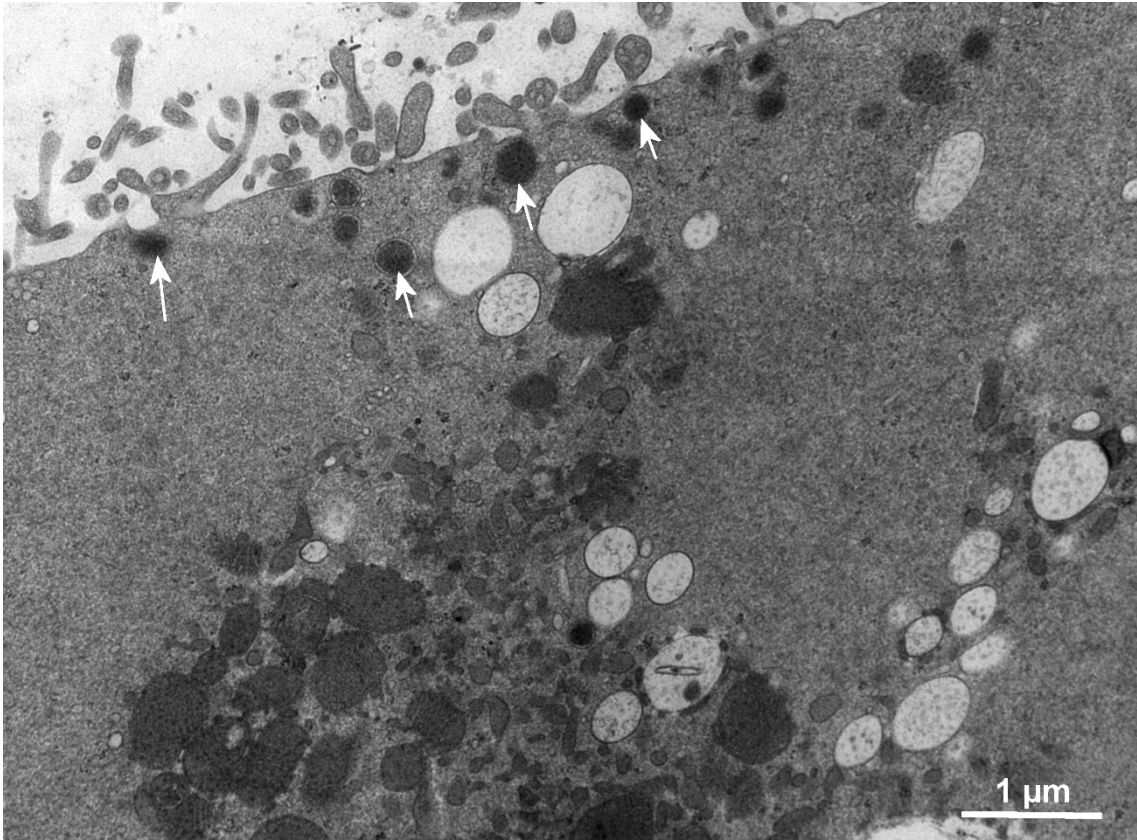


Figura 10. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 3D-50R indicando grânulos corticais (setas brancas) paralelos à membrana plasmática com densidade variada

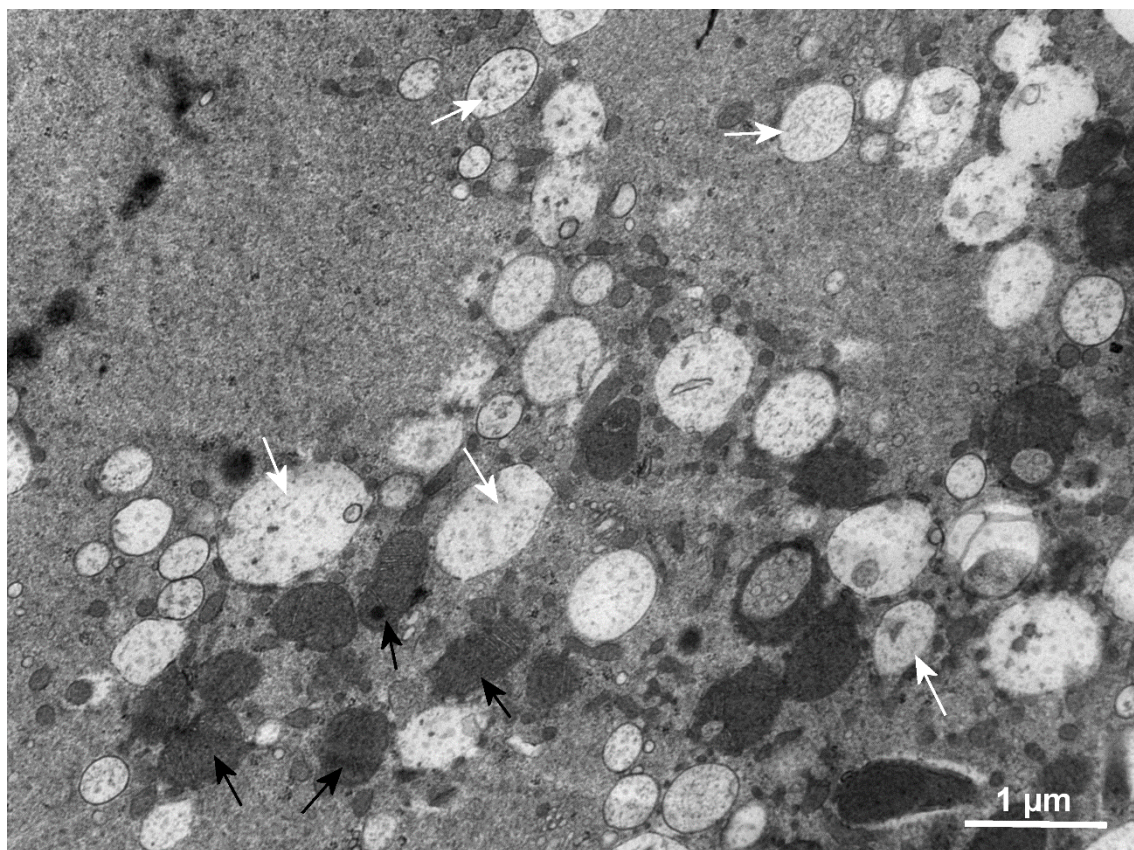


Figura 11. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 3D-50R indicando mitocôndrias (setas pretas) e vacúolos (setas brancas) com colocalização de ambas as estruturas

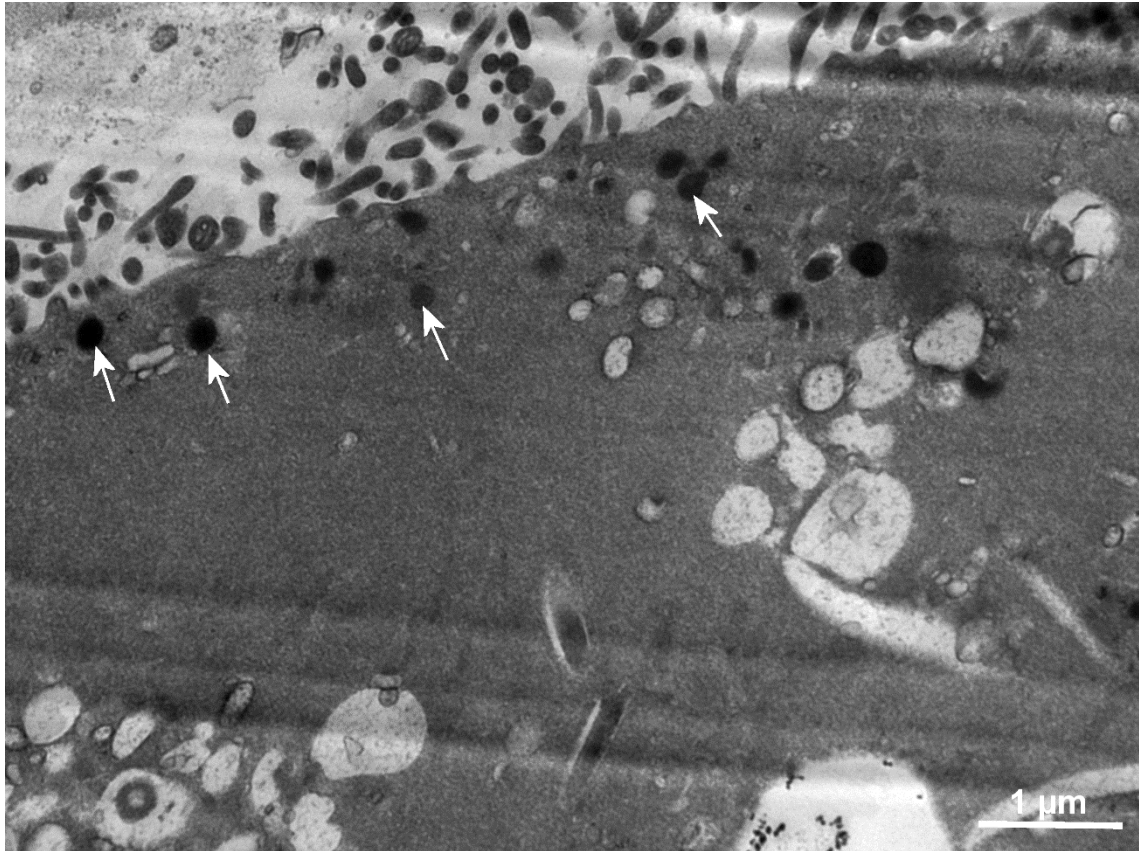


Figura 12. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 3D-75B indicando grânulos corticais (setas brancas) presentes em grande quantidade, alinhados à membrana, formando clusters

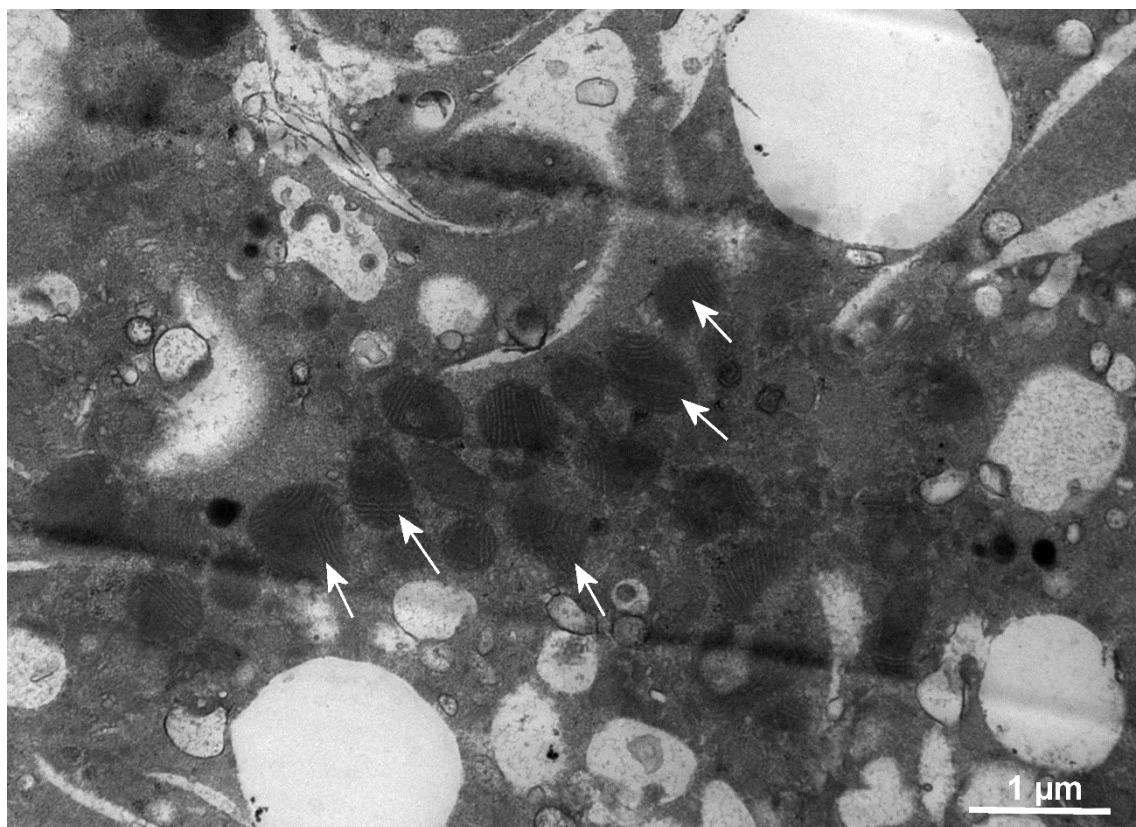


Figura 13. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 3D-75B indicando mitocôndrias (setas brancas) formando pequenos clusters com pequena quantidade e localizadas de maneira central no citoplasma

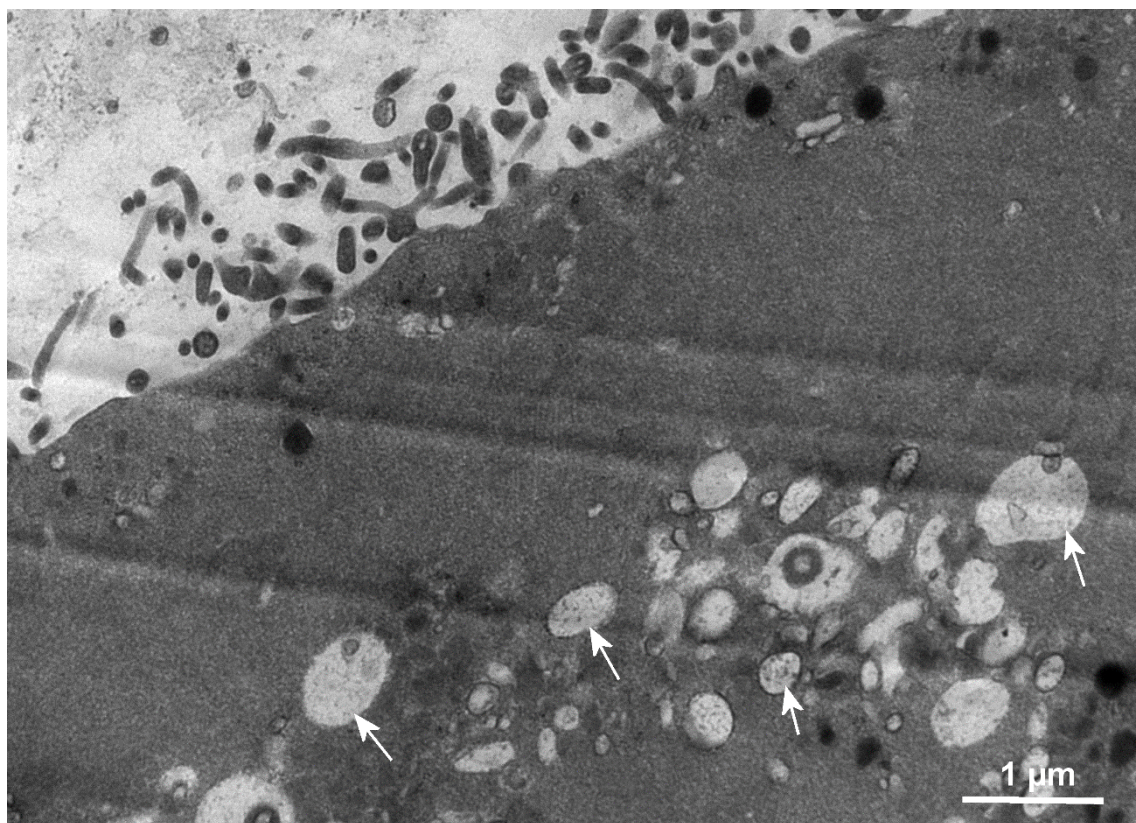


Figura 14. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 3D-75B indicando vacúolos (setas brancas) dispersos pelo citoplasma e em grande quantidade

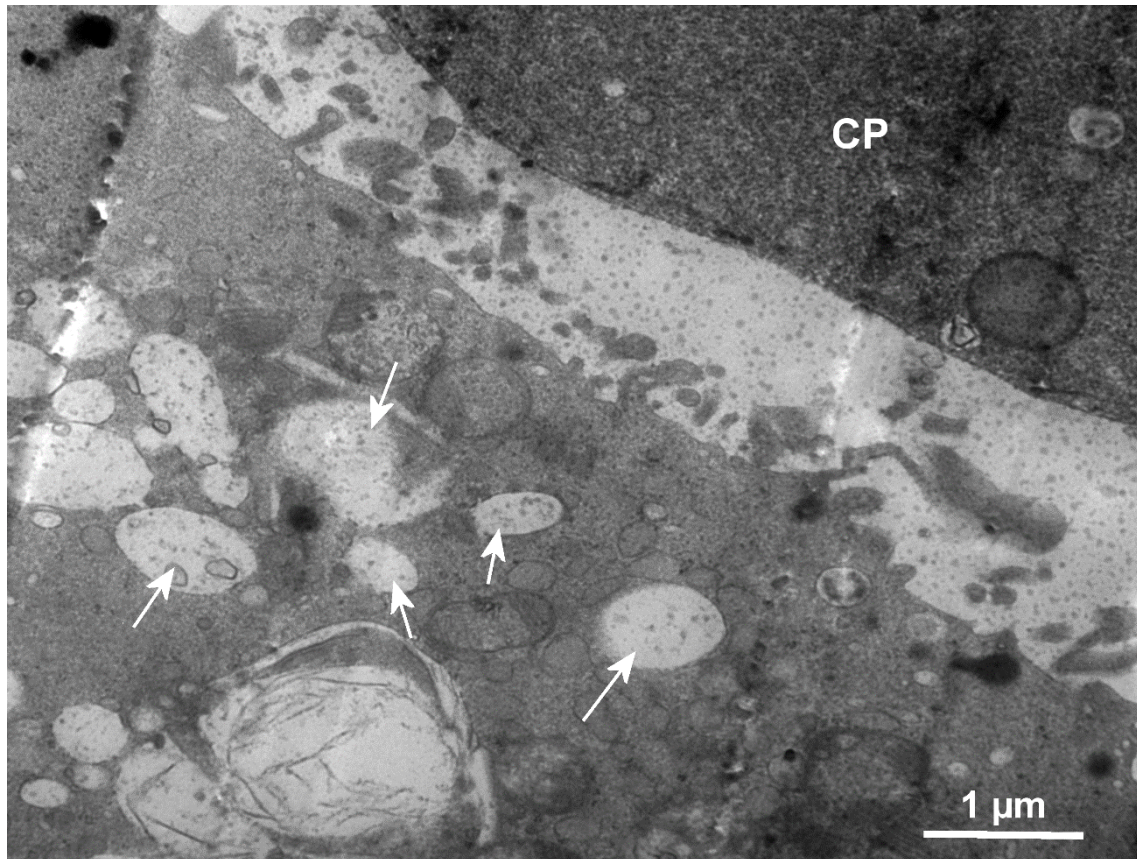


Figura 15. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 3D-75R indicando vacúolos (setas brancas) em grande quantidade formando clusters formados apenas por essas estruturas

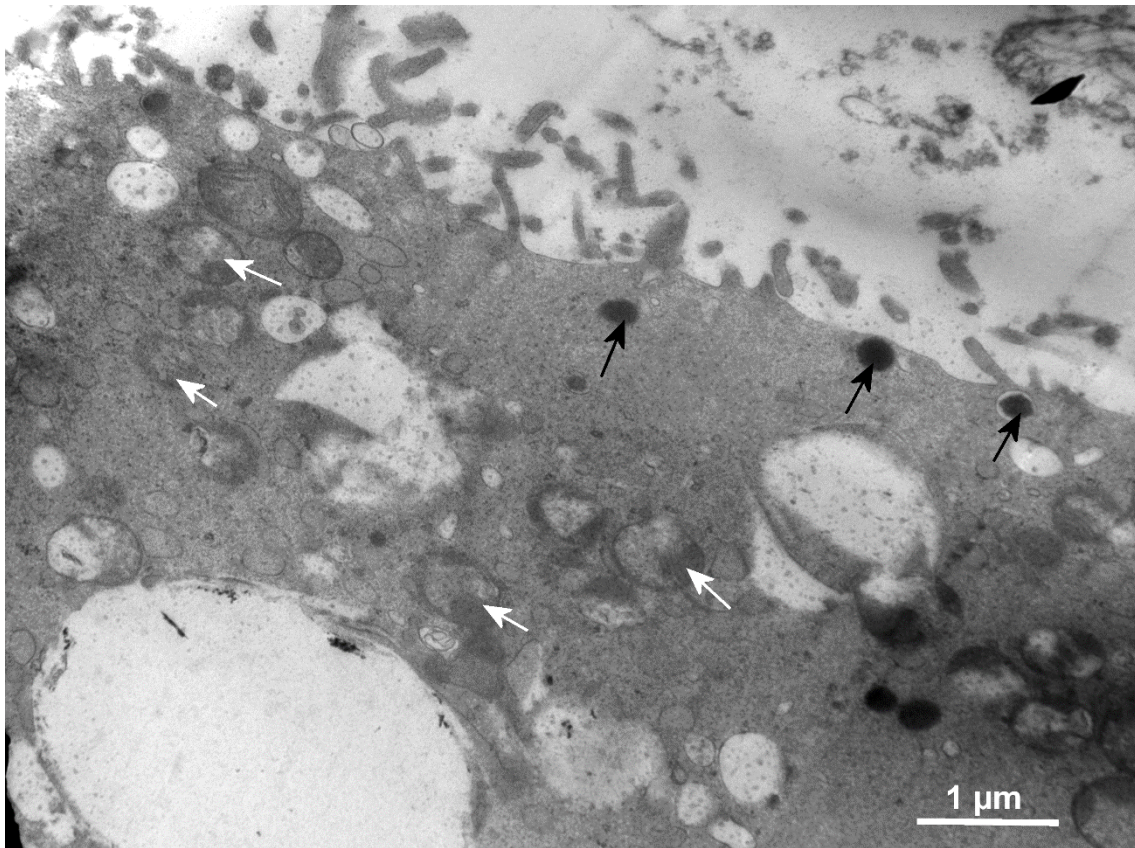


Figura 16. Eletromicrografia do citoplasma de ovócito bovino do grupo 3D-75R indicando mitocôndrias, em pouca quantidade, tendendo a vacuolização (setas brancas) e grânulos corticais (setas pretas) alinhados à membrana plasmática

5.4. Análise de Correlação

Foi observada associação positiva entre as taxas de clivagem e blastocisto ($P = 0,033$). Em contrapartida, houve associação negativa entre a produção de espécies reativas de oxigênio e taxa de blastocisto ($P = 0,040$) e também entre área ocupada por vacúolos e área ocupada por mitocôndria ($P = 0,032$).

Tabela 09. Matriz de correlação entre as variáveis clivagem; blastocisto; área mitocondrial; área de vacúolos; área de grânulos corticais; produção de EROS

<i>Matriz de Correlação: Pearson</i>						
	<i>Clivagem</i>	<i>Blastocisto</i>	<i>Mitocôndria</i>	<i>Vacúolo</i>	<i>Grânulos Corticais</i>	<i>EROS</i>
Clivagem	1					
Blastocisto	0,846*	1				
Mitocôndria	-0,016	0,174	1			
Vacúolo	-0,104	-0,292	-0,849*	1		
Grân.Corticais	0,170	0,344	-0,388	-0,029	1	
EROS	-0,707	-0,830*	-0,368	0,171	0,128	1

* Valores que apresentaram correlação significativa ($P < 0,05$)

6. Discussão

O tratamento 3D-75R beneficiou a clivagem de ovócitos maturados no sistema tridimensional, efeito esse que não prosseguiu na produção de blastocistos o que pode ser reflexo da baixa quantidade de mitocôndrias presentes no citoplasma que podem não ter sido suficientes para sustentar o desenvolvimento embrionário inicial. Adicionalmente, o grupo 3D-75B apresentou produção embrionária semelhante ao grupo controle de ovócitos de boa qualidade, ou seja, não interferiu nestes processos. Estudo utilizando ovócitos de camundongos e de humanos com cultivo 3D em matriz colágena em gel, no estágio de pré-maturação, obtiveram taxas de clivagem maiores que no cultivo bidimensional em ambas espécies (VANHOUTTE et al., 2009). Outro trabalho desenvolvido com camundongos, os ovócitos desnudos co-cultivados com células do cumulus em sistema 3D de matriz óssea desmineralizada obtiveram taxas de clivagem e blastocistos semelhantes a COCs cultivados em microgotas (SUOFENG et al., 2007). O sistema tridimensional por levitação magnética foi utilizado no cultivo de folículos pré-antrais bovinos e favoreceu os ovócitos inclusos a concluírem a meiose I (ANTONINO, 2018), porém não teve o mesmo efeito favorável no cultivo de ovócitos imaturos.

As amostras apresentaram altas taxas de viabilidade celular assim como baixas taxas de morte e apoptose celular. As nanopartículas adicionadas não causaram estresse nos COCs a ponto de levar as células a um processo de apoptose e os efeitos sofridos no processo de maturação ovocitária não prejudicaram a viabilidade dos embriões que alcançaram o estágio de blastocisto, porém o aumento da produção de EROS mostra que existiu algum estresse causado pela metodologia empregada, o que não condiz com os resultados apresentados por Souza et al. (2010) que constatou ausência de toxicidade, indução de resposta inflamatória e interferência na proliferação celular causada pelas nanopartículas. Estudo anterior realizado com cultivo de folículos pré-antrais de bovinos, folículos cultivados utilizando nanopartículas (3D) apresentaram maior viabilidade e formação de antro, além de menor taxa de degeneração comparado ao grupo controle (2D) (ANTONINO et al., 2018).

Os grupos de ovócitos de boa qualidade maturados no sistema tradicional e tridimensional com 50 μ L de nanopartículas apresentaram proporção de área ocupada por mitocôndrias superior aos demais grupos. Notou-se também que houve decréscimo na quantidade de mitocôndrias no grupo 3D-75B. A alta concentração de nanopartículas pode ter reduzido a replicação mitocondrial. Na avaliação visual foi possível notar que os grupos 2DB

e 3D-50B se assemelham na quantidade e na distribuição de mitocôndrias. Os grupos de ovócitos ruins, entre si, apresentaram o mesmo tipo de distribuição mitocondrial. A competência ovocitária está diretamente relacionada à distribuição e quantidade de mitocôndrias no citoplasma (VAN BLERKOM, 2009; ZENG et al., 2009). Vários aspectos mitocondriais são alterados na maturação do ovócito, especialmente na quantidade de organelas (DUMOLLARD et al., 2007). Dessa maneira, um ovócito maduro apresenta grande quantidade de mitocôndrias (READER et al., 2015) com distribuição homogênea no citoplasma (HYTTEL et al., 1986), visto que elas não se multiplicam durante as primeiras clivagens do embrião (DUMOLLARD et al., 2007) e, portanto, devem estar em quantidade suficiente com distribuição igualitária para que os blastômeros do embrião consigam sobreviver ao desenvolvimento embrionário inicial (VAN BLERKOM, 2009). Ovócitos de boa qualidade de vacas e porcas são mais propensos a ter distribuição uniforme das mitocôndrias do que ovócitos de qualidade inferior (STOJKOVIC et al., 2001; BREVINI et al., 2005). Um pequeno número de estudos comparou quantidade de mitocôndrias entre ovócitos de diferentes qualidades (boas e ruins), no entanto suportaram a premissa de que ovócitos de boa qualidade possuem maior número de mitocôndria (READER et al., 2017).

Os grupos de ovócitos de baixa qualidade e de boa qualidade com a maior concentração de nanopartículas apresentaram as maiores taxas de emissão de espécies reativas de oxigênio. Além disso, foi observada uma correlação negativa entre a emissão de EROS e a produção de blastocistos. Como não há gênese de mitocôndria entre o término da maturação ovocitária e as primeiras divisões celulares do embrião (DUMOLLARD et al., 2007), a diminuição da quantidade de mitocôndrias e o aumento da emissão de espécies reativas pode ser uma resposta negativa da alta concentração das nanopartículas. Fisiologicamente, EROS são essenciais para a maturação nuclear, porém o desequilíbrio entre a produção de EROS e a capacidade antioxidativa da célula podem gerar danos no DNA e levar a apoptose (revisado por ROTH, 2018). Quando comparados ovócitos de murinos maturados *in vivo* com ovócitos maturados *in vitro*, os de MIV apresentaram níveis mais altos de EROS considerados prejudiciais (GE et al., 2012).

Os grupos 3D-50R, 3D-50B e 2DB apresentaram menores proporções de áreas ocupadas por vacúolos. Este resultado é visto como positivo, pois pode-se sugerir que a utilização de nanopartículas na concentração de 50 μ L evitou a formação de vacúolos nos ovócitos de boa e baixa qualidade durante a maturação *in vitro*. Adicionalmente, os grupos de ovócitos ruins maturados com nanopartículas apresentaram menor quantidade de vacúolos

com distribuição homogênea formando poucos clusters quando comparados ao grupo de ovócitos ruins maturados no sistema tradicional. Na avaliação ultraestrutural também foi possível notar uma colocação de ambas estruturas, o que sugere que parte dos vacúolos possam ser resultados de processos de autofagia mitocondrial. A autofagia ocorre quando os autofagossomos capturam componentes do citoplasma celular e encaminham aos lisossomos que são encarregados de realizar a degradação destes componentes (LIN et al, 2018). Este processo foi observado em um trabalho desenvolvido por Escobar Sánchez et al (2012), onde viram que os ovócitos de ratos apresentavam proteínas envolvidas no processo de autofagia.

No presente estudo, os tratamentos aplicados bem como a qualidade dos ovócitos não influenciaram na proporção da área ocupada por grânulos corticais e em sua distribuição. A distribuição e localização dos grânulos corticais são indicativos de maturação ovocitária (DAMIANI, 1996). Após a maturação, os grânulos migram do interior do citoplasma para se alinharem à membrana (HALEY e WESSEL, 2004), após a fertilização liberam seu conteúdo no espaço perivitelínico que resulta no endurecimento da zona pelúcida (PAPI et al., 2010), mecanismo esse de defesa contra a poliespermia (LIU, 2011; DROBNIS et al., 1988). De Paz et al. (2001) não encontraram diferença na quantidade de grânulos de ovócitos maturados *in vivo* de vacas juvenis e adultas. O'Brien et al. (1996) observaram menor volume e tamanho dos grânulos corticais em ovócitos de ovelhas pré-púberes quando comparadas a ovelhas adultas.

No presente estudo, os grupos que, visualmente, apresentaram maior quantidade de microvilos foram o 2DB e 3D-75B, os mesmos que se destacaram na taxa de clivagem e de blastocistos, o que condiz com a importância do desenvolvimento dessas estruturas no processo de maturação já que exercem um importante papel nas funções de secreção e absorção da célula (GUSTINA et al., 2017), além de estudos demonstrarem o envolvimento do espermatozoide pelos microvilos para assim se fundir à membrana do ovócito (SHALGI e PHILLIPS, 1980). Estudos realizados com ovócitos de camelos maturados *in vitro* mostram que existe um aumento na quantidade de microvilos no espaço perivitelínico após 24 horas de maturação (KAFI et al., 2005). Estudos realizados anteriormente revelam que os microvilos dos ovócitos apresentam a proteína CD9, proteína esta que é necessária na fusão entre o espermatozoide e a membrana do ovócito (KAJI et al., 2000).

Todas as amostras apresentaram uma boa polimerização da actina no córtex celular. Por outro lado, a polimerização de actina no citoplasma variou entre os tratamentos e até

dentro do mesmo tratamento, não podendo servir como referência única para maturação ovocitária. De maneira geral, a polimerização citoplasmática ficou mais intensa nos ovócitos tratados. Os três tipos de filamentos que compõem o citoesqueleto celular – actina, tubulina e filamentos intermediários – são polímeros formados por subunidades menores que mantêm ligações fracas e não covalentes que podem se associar e desassociar de acordo com a necessidade da célula (THEURKAUF et al., 1992). No estágio de VG, microfilamentos estão dispersos pelo citoplasma do ovócito de camundongos (SUN e SCHATTEN, 2006). Após a quebra da vesícula germinativa, os filamentos de actina se acumulam na região cortical do ovócito, observação realizada em experimentos realizados com camundongos (GUMUS et al., 2010; SUN e SCHATTEN, 2006; VERLHAC et al., 2000).

Na avaliação da espessura dos ovócitos, a ausência de diferenças estatísticas entre os tratamentos pode ser justificada por falhas na metodologia empregada, pois ao depositar os ovócitos entre lâminas e lamínulas houve um achatamento e alteração da estrutura tridimensional dos mesmos. Quando avaliados sem a utilização de lâminas e lamínulas não foi possível obter foco no microscópio Confocal, sendo necessário pesquisar novas metodologias para avaliação tridimensional de ovócitos nesse tipo de aparelho.

Dessa maneira, a utilização das nanopartículas casou grandes impactos no desempenho da maturação citoplasmática, principalmente na produção de EROS e distribuição mitocondrial, sendo refletidos nos resultados da PIVE.

7. Conclusão

A utilização de nanopartículas e levitação magnética na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos de boa qualidade não interferiu nos resultados de PIVE. No entanto, esta metodologia melhorou os resultados de clivagem de ovócitos de qualidade ruim. Independentemente dos resultados da PIVE, a microscopia eletrônica, a avaliação da polimerização de filamentos de actina e a quantificação de EROs indicam que a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos utilizando nanopartículas e levitação magnética foi prejudicada na maturação citoplasmática.

8. Referências Bibliográficas

- AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p.257-265, 1993. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0980257>
- ANGUITA, B.; PARAMIO, M.T.; JIMENEZ-MACEDO, A.R.; MORATÓ, R.; MOGAS, T.; IZQUIERDO, D. Total RNA and protein content, Cyclin B1 expression and developmental competence of prepubertal goat oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.103, p.290-303, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.12.018>
- ANTONINO, D.C.; SOARES, M.M.; DE MELO JR, J.; ALVARENGA, P.B.; MOHALLEM, R.F.F.; ROCHA, C.D.; VIEIRA, L.A.; SOUZA, A.G.; BELETTI, M.E.; ALVES, B.G.; JACOMINI, J.O.; GOULART, L.R.; ALVES, K.A. Three-dimensional (3D) levitation culture improves the in vitro growth of secondary follicles in bovine model. **Reproductive BioMedicine Online**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.11.013>
- ARAÚJO, V. R.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E.L. *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 12, p. 78, 2014. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-78>
- BELETTI, M. E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 92-96, 2013.
- BERNARDI, M. L. Produção *in vitro* de embriões ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 33, n. 1, p. 1-16, 2005. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.14418>
- BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C.; STUBBING, R.B., XU, K.P.; KING, W. A. Potencial genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p. 87-98, 1989.
- BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F. AND DRESSEL, M.A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of. Reproduction**. v.27, n.1, p.147-158, 1982. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.1.147>

BREVINI, T.A.L.; FRANCISCI, R.V. C.; GANDOLFI, F. Role of Adenosine Triphosphate, Active Mitochondria, and Microtubules in the Acquisition of Developmental Competence of Parthenogenetically Activated Pig Oocytes . **Biology of Reproduction**, v.72, p.1218–1223, 2005. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.038141>

COMPORTI, M. Three models of free radical induced cell injury. **Chemistry and Biology Interact**, v.72, p.1-56, 1989. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(89\)90016-1](https://doi.org/10.1016/0009-2797(89)90016-1)

CROCOMO, L. F.; MARQUES FILHO, W. C.; SUDANO, M. J.; PASCHOAL, D. M.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; BICUDO, S. D. Effect of roscovitine and cycloheximide on ultrastructure of sheep oocytes. **Small Ruminant Research**. v.109, p.156-162, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.07.006>

DADARWAL, D.; ADAMS, G. P.; HYTTEL, P.; BROGLIATTI, G. M.; CALDWELL, S.; SINGH, J. Organelle reorganization in bovine oocytes during dominant follicle growth and regression. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.13, p.124, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0122-0>

DAMIANI, P.; FISSORE, R. A.; CIBELLI, J. B.; LONG, C. R.; BALISE, J. J.; ROBL, J. M.; DUBY, R. T. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, n. 4, p. 521-534, 1996. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199612\)45:4<521::AID-MRD15>3.3.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199612)45:4<521::AID-MRD15>3.3.CO;2-H)

DAQUINAG, A. C.; SOUZA, G. R.; KOLONIN, M. G. Adipose tissue engineering in three-dimensional levitation tissue culture system based on magnetic nanoparticles. **Tissue engineering. Part C, Methods**, v. 19, n. 5, p. 336–44, 2013. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0198>

DE PAZ, P.; SANCHEZ, A. J.; DE LA FUENTE, J.; CHAMORRO, C. A.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; ANEL, L. Ultrastructural and cytochemical comparison between calf and cow oocytes. **Theriogenology**, v. 55, p. 1107-1116, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00470-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00470-8)

DODE, M.A.N. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. In: XX Reunião anual da sociedade brasileira de tecnologia de embriões. **Anais: Acta Scientiae Veterinariae**, Araxá: Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, p.115 – 130, 2006.

DROBNIS, E.Z.; ANDREW, J.B.; KATZ, D.F. Biophysical properties of the zona pellucida measured by capillary suction: is zona hardening a mechanical phenomenon? **Journal of Experimental Zoology**, 1988. <https://doi.org/10.1002/jez.1402450210>

DUMOLLARD, R.; DUCHEN, M.; CARROLL, J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 77; p. 21–49, 2007. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(06\)77002-8](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(06)77002-8)

ESCOBAR-SÁNCHEZ, M. L., ECHEVERRÍA-MARTÍNEZ, O. M. & VÁZQUEZ-NIN, G. H. Immunohistochemical and ultrastructural visualization of different routes of oocyte elimination in adult rats. *European Journal of Histochemistry*, v. 56, n. 2, p. 17, 2012. <https://doi.org/10.4081/ejh.2012.17>

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J.R.V. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Roca. cap. 16, p. 303-327, 2008.

GE, H.; TOLLNER, T.L.; HU, Z.; DAI, M.; LI, X.; GUAN, H.; SHAN, D.; ZHANG, X.; LV, J.; HUANG, C. The importance of mitochondrial metabolic activity and mitochondrial DNA replication during oocyte maturation *in vitro* on oocyte quality and subsequent embryo developmental competence. **Molecular reproduction development**, v. 79, p. 392-401, 2012. <https://doi.org/10.1002/mrd.22042>

GILCHRIST, R.B.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of *cumulus* cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v. 14, p. 159-177, 2008. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm040>

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008.

GORDON, I. Prenatal Development of the Bovine Ovary. In: Gordon, I. Laboratory production of cattle embryos. Cambridge: CAB International: **New York, Raven Press**, P; 4349, 1994.

GREEN, L. J.; SHIKANOV, A. *In vitro* culture methods of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 229–238, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.036>

GUERIN, P.; MOUATASSIM, S.E.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, p.175-189, 2001. <https://doi.org/10.1093/humupd/7.2.175>

GUMUS, E.; BULUT, H.E.; KALOGLU, C. Cytoskeletal changes in oocytes and early embryos during *in vitro* fertilization process in mice. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 39, p. 51-58, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2009.00982.x>

GUSTINA, S.; HASBI, H.; KARJA, N.W.K.; SETIADI, M.A.; SUPRIATNA, I. Ultrastructure changes in buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes before and after maturation *in vitro* with sericin. **Animal Science Journal**, v. 88, p. 1911-1915, 2017. <https://doi.org/10.1111/asj.12839>

HAISLER, W. L.; TIMM, D.M.; GAGE, J.A.; TSENG, H.; KILLIAN, T.C.; SOUZA, G.R. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. **Nature Protocols**, v. 8, n. 10, p. 1940–9, 2013. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.125>

HALEY, S.A.; WESSEL, G.M. Regulated proteolysis by cortical granule serine protease 1 at fertilization. **Molecular and Cellular Biology**, v.15, p.2084-2092, 2004. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-11-0843>

HANSEN, P.J. Realizing the promise of IVF in cattle – an overview. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 119-125, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.019>

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovarian. **International Review of Cytology**, v. 124, p. 43-101, 1991. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61524-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61524-7)

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.

<https://doi.org/10.3934/bioeng.2016.3.277>

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

<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0780615>

HYTTEL, P. Electron microscopy of mammalian oocyte development, maturation and fertilization. In *OOCYTE MATURATION AND FERTILIZATION: A LONG HISTORY FOR A SHORT EVENT*, Bentham Science Publishers, Oak Park, USA, p. 1-37, 2011.

<https://doi.org/10.2174/978160805182311101010001>

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

KAFI, M.; MESBAH, F.; NILI, H.; KHALILI, A. Chronological and ultrastructural changes in camel (*Camelus dromedaries*) oocytes during *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v. 63, p. 2458-2470, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.059>

KAJI, K.; ODA, S., SHIKANO, T., OHNUKI T., UEMATSU Y., SAKAGAMI J., TADA, N., MIYAZAKI, S., KUDO, A. The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nature Genetics*, v. 24, n. 3, p. 279–282, 2000. <https://doi.org/10.1038/73502>

KANE, M.T. A review of *in vitro* gamete maturation and embryo culture and potencial impact on future animal biotechnology. **Animal Reproduction Science**, v. 79, n. 3-4, p. 171-190, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00164-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00164-7)

LANDIM-ALVARENGA, F. C.; CHOI, Y. H. *In vitro* maturation of equine oocytes without hormones. **Theriogenology**. v.51, p.383, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)91942-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)91942-8)

LEWIS, W.H.; GREGORY, P.W. Cinematographs of living developing rabbit eggs. **Science** v. 69, p.226-229, 1929. <https://doi.org/10.1126/science.69.1782.226-a>

LIN, F.; ZHANG, W.; LI, H.; TIAN, X.; ZHANG, J.; LI, X.; LI, C.; TAN, J. Role of autophagy in modulating post-maturation aging of mouse oocytes. **Cell death & disease**, v. 9, n. 3, p. 308, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0368-5>

LIU, M. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, n. 1, p.149, 2011. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-149>

LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro* produced embryo-Dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, p.17-22, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.007>

LUCIO, A.C.; ALVES, B.G.; ALVES, K.A.; MARTINS, M.C.; BRAGA, L.S.; MIGLIO, L.; ALVES, B.G.; SILVA, T.H.; JACOMINI, J.O.; BELETTI, M.E. Selected sperm traits are simultaneously altered after scrotal heat stress and play specific roles in *in vitro* fertilization and embryonic development. **Theriogenology**, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.015>

CBRA (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3ª ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

MARTINS, F. S. ; SILVA, J.R.V; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 1, p. 36–49, 2008.

MEIRELLES, F.V; CAETANO, A.R.; WATANABE, Y.F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S.F.; MERIGHE, G.K.; GARCIA, S.M; Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.13-20, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.012>

MINGOTI, G. Z. ; GARCIA, J. M. ; ROSA E SILVA, A. A. M. . Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured *in vitro* with BSA and different concentrations of steroids.. **Animal Reproduction Science**, v.69, p.175-186, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00187-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00187-7)

MOLINA, J.R.; HAYASHI, Y.; STEPHENS, C.; GEORGESCU, M. Invasive glioblastoma cells acquire stemness and increased Akt activation. **Neoplasia**, v. 12, p. 453, 2010. <https://doi.org/10.1593/neo.10126>

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V. Início do desenvolvimento humano. *In*: Moore KL, Persaud TVN. **Embriologia Clínica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 13-38 1994.

NEUBERGER, T.; SCHOPF, B.; HOFMANN, H.; HOFMANN, M.; RECHENBERG, B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, n. 1, p. 483–496, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2005.01.064>

O'BRIEN, J.K.; DWARTE, D.; RYAN, J.P.; MAXWELL, W.M.; EVANS, G. Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. **Reproduction Fertility Development**, v. 8, p. 1029-1037, 1996. <https://doi.org/10.1071/RD9961029>

O'BRIEN, J.K.; DWARTE, D.; RYAN, J.P.; MAXWELL, W.M.; EVANS, G. Comparison of *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, metabolism and ultrastructure of oocytes from prepubertal and adult pigs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 35, p. 101-107, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2000.d01-2.x>

PAPI, M.; BRUNELLI, R. ; SYLLA, L. PARASASSI, T. ; MONACI, M. ; MAULUCCI, G. Mechanical properties of zona pellucida hardening. **European Biophysics Journal**, v. 39, p. 987-998, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00249-009-0468-3>

PETERS, H. Migration of gonocytes in to mammalian gonad and their differentiation. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v.259, p.91-101, 1970. <https://doi.org/10.1098/rstb.1970.0048>

PICTON, H., BRIGGS, D., GOSDEN, R.; The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.145, p.27-37, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(98\)00166-X](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00166-X)

PINCUS, G.; ENZMANN, E. The comparative behavior of mammalian eggs *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of Experimental Medicine**. v.62, p.665-675, 1935. <https://doi.org/10.1084/jem.62.5.665>

READER, K.L.; STANTON, J.A.L.; JUENGEL, J.L. The Role of Oocyte Organelles in Determining Developmental Competence. **Biology**, v. 6, n. 3, p.35, 2017. <https://doi.org/10.3390/biology6030035>

READER, K. L.; COX, N. R.; STANTON, J. A. L.; JUENGEL, J. L. Mitochondria and vesicles differ between adult and prepubertal sheep oocytes during IVM. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27; p. 513–522, 2015. <https://doi.org/10.1071/RD13359>

ROTH, Z. Reduction in oocyte developmental competence by stress is associated with alterations in mitochondrial function. **Journal Dairy Science**, v. 101, p. 1-13, 2018. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13389>

RUBIN, K.C.P. **Particularidades reprodutivas da raça Nelore na produção *in vitro* de embriões (PIVE)**. 2006. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2006.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatômica**, v.24, p.77-92, 1983.

SÁNCHEZ, F., SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, p.1896-1912, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.013>

SHALGI, R., PHILLIPS, D. M. Mechanics of *in vitro* fertilization in the hamster. **Biology of Reproduction**, v. 23, p. 433–444, 1980. <https://doi.org/10.1095/biolreprod23.2.433>

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**.v.55, p.1241-1254, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00480-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00480-0)

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte quality. **Theriogenology**, v. 65, p. 126-136, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.020>

SMITZ, J. E., CORTVRINDT, R. G. The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. **Reproduction**, v.123, p.185-202, 2002. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230185>

SOUZA, G.; R.; MOLINA, J. R.; RAPHAEL, R. M.; OZAWA, M. G.; STARK, D. J.; LEVIN, C. S.; BRONK, L. F.; ANANTA, J. S.; MANDELIN, J.; GEORGESCU, M.; BANKSON, J. A.; GELOVANI, J. G.; KILLIAN, T. C.; ARAP, W.; PASQUALINI, R. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. **Nature Nanotechnology**, v. 5, p. 291-296, 2010. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.23>

STEPTOE, P. C.; EDWARDS, R. G. Birth after the reimplantation of a human embryo. **Lancet**, v.2, p. 366, 1978. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(78\)92957-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(78)92957-4)

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 904-909, 2001. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>

SUN, Q.Y.; SCHATTEN, H. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. **Reproduction**, v. 131, p. 193-205, 2006. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00847>

SUOFENG, M.; LIN, H.; MIAO, Y. LIU, X.; WANG, B.; DAI, J. The effect of three-dimensional demineralized bone matrix on *in vitro* cumulus-free oocyte maturation. **Biomaterials**, v. 28, p. 3198-3207, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.03.007>

SWAIN, J.E.; POOL, T.B. ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization. **Human Reproduction Update**, v. 14, p. 431-446, 2008. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn025>

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. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130001et>

THEURKAUF, W.E.; SMILEY, S.; WONG, M.L.; ALBERTS, B.M. Reorganization of the cytoskeleton during Drosophila oogenesis: implications for axis specification and intercellular transport. **Development**, v. 115, p. 923-936, 1992.

TOYODA, Y.; CHANG, M. Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. **Journal Reproduction & Fertility**. v.36, n.1, p. 9-22, 1974. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0360009>

VAN BLERKOM, J. Mitochondria in early mammalian development. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 20, n. 3, p. 354–364, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.12.005>

VANHOUTTE, L.; NOGUEIRA, D.; DUMORTIER, F.; DE SUTTER, P. Assessment of a new *in vitro* maturation system for mouse and human cumulus-enclosed oocytes: three dimensional prematuration culture in the presence of a phosphoesterase 3-inhibitor. **Human Reproduction**, v. 24, n. 8, p. 1946-1959, 2009. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep104>

VERDE, F.; DOGTEROM, M.; STELZER, E.; KARSENTI, E.; LEIBLER, S. Control of microtubule dynamics and lenght by cyclin A-dependent and cyclin B-dependent kinases in Xenopus eggs extracts. **The Journal of Cell Biology**. v.118, p.1097-1108, 1992. <https://doi.org/10.1083/jcb.118.5.1097>

VERLHAC, M.H.; LEFEBVRE, C.; GUILLAUD, P.; MARO, B. Asymmetric division in mouse oocytes with ou without Mos. **Current Biology**, v. 10, p. 1303-1306, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00753-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00753-3)

WHITTEN, W.K.; BIGGERS, J.D. Complete development *in vitro* of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 17, n.2, p.399-401,1968. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0170399>

YING, Y.; QI, X.; ZHAO, G-Q. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP-4 and BMP-8b signaling pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.14, p.7858-7862, 2001.
<https://doi.org/10.1073/pnas.151242798>

ZENG, H. T., YEUNG, W. S., CHEUNG, M. P., HO, P. C., LEE, C. K., ZHUANG, G. L., LIANG, X. Y., and O, W. S. *In vitro*-matured rat oocytes have low mitochondrial deoxyribonucleic acid and adenosine triphosphate contents and have abnormal mitochondrial redistribution. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 3, p. 900–907, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.12.008>