

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

FLORENTINO PAZ JOSÉ DA SILVA JÚNIOR

**ANÁLISE DA TAXA DE PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS
COM A UTILIZAÇÃO DO RESVERATROL NA MATURAÇÃO
OOCITÁRIA**

UBERLÂNDIA – MG

2019

FLORENTINO PAZ JOSÉ DA SILVA JÚNIOR

**ANÁLISE DA TAXA DE PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS
COM A UTILIZAÇÃO DO RESVERATROL NA MATURAÇÃO
OOCITÁRIA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do curso graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à aprovação na disciplina de Trabalho de conclusão de curso II.

Orientador: Profa. Dra. Ricarda Maria dos Santos

UBERLÂNDIA – MG

2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de poder lutar pelos meus sonhos.

A meu pai Florentino que já não se encontra fisicamente, mas que está presente em meu coração. Obrigado por ter me apoiado nas minhas escolhas desde o início e além de tudo, ter sido meu herói. Seus ensinamentos e lições nunca serão esquecidos. Tudo que sou hoje, é graças ao senhor.

A minha mãe, Vânia, pelo incentivo e compreensão principalmente nos dias marcados pela tristeza e angústia.

A meu irmão, Arsênio, pela torcida e por sempre estar ao meu lado.

A minha namorada, Bruna, por me ouvir e acreditar em mim, mesmo quando tudo parecia perdido. Obrigado pelo companheirismo e por todo suporte durante a minha caminhada

Aos meus amigos, em especial a Beatriz, Fabiana, Amanda e Fernanda por todos os momentos que passamos juntos. Obrigado por todo apoio principalmente nas horas de mais desespero.

A professora Rute, por ter me acolhido no início da minha caminhada e por todos os ensinamentos transmitidos. Sua ajuda foi fundamental para meu crescimento. Obrigado por aceitar o convite para compor minha banca.

A minha orientadora Ricarda que me acolheu num momento que era marcado por tantas incertezas e indecisões. Obrigado por todos os ensinamentos e todo apoio durante a reta final da minha graduação. Não poderia ser melhor. Gratidão por tudo!

Aos colegas do laboratório de reprodução animal, em especial a Mayara, Gracie e Soraia, que nunca mediram esforços para me ajudar. Obrigado por não terem desistido de mim. Nada disso seria possível sem a contribuição de vocês.

Por fim, a todos que de uma forma ou outra fizeram parte da minha caminhada,

Meu grande Muito Obrigado!

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica que visa aumentar a velocidade de produção de animais geneticamente superiores. Esse processo ainda é considerado ineficiente e estagnado, apresentando baixa produção embrionária e com qualidade inferior. Objetivou-se avaliar os efeitos do resveratrol ligado a nanopartículas como antioxidantes durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos na taxa de clivagem e de blastocistos. Os oócitos utilizados para produção *in vitro* de embriões foram obtidos pelo método de aspiração dos folículos ovarianos de ovários coletados de vacas em abatedouro-frigorífico no município de Uberlândia-MG, variando a raça, idade e peso dos animais. Após a seleção, os oócitos seguiram para a etapa de maturação *in vitro* (MIV) divididos de acordo com os tratamentos: controle, resveratrol diluído a 0,5 μM e 1,0 μM e resveratrol ligado a nanopartículas de sílica nas concentrações 0,5 μM e 1,0 μM . A fecundação foi feita na placa de FIV sendo realizada com sêmen selecionado do mesmo touro para todas as réplicas. Finalizado o período da FIV os possíveis zigotos foram transferidos para a placa de cultivo CIV. Quarenta e oito horas após a fecundação, foi contado o número de estruturas que se dividiram (taxa de clivagem) e após sete dias, foi avaliado o número de blastocistos (taxa de blastocisto). Os dados foram analisados por regressão logística no programa MINITAB, sendo incluído no modelo o efeito de tratamento. A significância estatística foi estabelecida como $P \leq 0,05$ e a tendência estatística como $0,05 < P \leq 0,10$. A utilização do resveratrol na concentração 0,5 μM e resveratrol ligado a nanopartícula nas concentrações de 0,5 μM e 1,0 μM não demonstrou vantagem para a taxa de produção de embriões quando comparado ao grupo sem tratamento. A utilização do resveratrol na concentração 1,0 μM reduziu a taxa de clivagem e tendeu a reduzir a taxa de blastocisto, porém associação do resveratrol em maior concentração às nanopartículas pareceu ser vantajoso, pois não causou efeito prejudicial na produção *in vitro* de embriões.

Palavras-chave: Embriões *in vitro*; estresse oxidativo; maturação oocitária; substâncias antioxidantes.

ABSTRACT

The *in vitro* embryo production (IVP) is a biotechnology that aims to increase the speed of production of genetically superior animals. This process is still considered inefficient and stagnant, presenting low embryo production and inferior quality. The objective of this study was to evaluate the effects of nanoparticles linked to resveratrol as antioxidants during the *in vitro* maturation of bovine oocytes on cleavage and blastocyst rates. The oocytes used for *in vitro* embryo production were obtained by the method of aspirations of ovarian follicles collected from cows in a slaughterhouse in the city of Uberlândia-MG, varying the breed, age and weight of the animals. After selection the oocytes proceeded to the *in vitro* maturation (IVM) stage, divided according to the treatments: control, resveratrol diluted at 0.5 μM and 1.0 μM and resveratrol bound to silica nanoparticles at concentrations 0.5 μM and 1.0 μM . Fertilization was performed on the IVF plate and with semen selected from the same bull for all replicas. After the IVG period, the possible zygotes were transferred to the CIV culture plate. Forty-eight hours after fertilization, the number of dividing structures (cleavage rate) was counted and after seven days, the number of blastocysts (blastocyst rate) was evaluated. The numbers were analyzed by logistic regression in the MINTAB program, and the treatment effect was included in the model. Statistical significance was set at $P \leq 0,05$ and statistical trend at $0,05 < P \leq 0,10$. The use of 0.5 μM resveratrol and resveratrol bounded to nanoparticles at 0.5 μM and 1 μM did not show any advantage for embryo production rate then compared to the untreated group. However, the use of resveratrol at 1 μM concentration reduced the cleavage rate and tended to reduce the blastocyst rate. Also, the use of resveratrol at 1.0 μM concentration associated to nanoparticles appeared to be advantageous because it did not cause any detrimental effects on *in vitro* production.

KEY WORDS: antioxidant substances; *in vitro* embryo; oxidative stress; oocyte maturation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 Produção <i>in vitro</i> de embrião	7
2.2 Produção de espécies reativas do oxigênio e o estresse oxidativo	9
3.3 Resveratrol	10
2.4 Nanopartículas	11
3. OBJETIVO	12
4. METODOLOGIA	12
4.1 Reagentes	12
4.2 Local e Animais	12
4.3 Obtenção e seleção dos complexos cumulus-oócitos (COCs)	12
4.4 Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	13
4.5 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	14
4.6 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	15
4.7 Análise estatística	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
6. CONCLUSÃO	17
REFÊRENCIAS	19

1.INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva dos rebanhos, principalmente bovinos, tem sido alvo de muitos estudos com intuito de aumentar o número de descendentes utilizando biotecnologias associadas à reprodução animal. De forma indireta, tem-se um aumento no mérito genético do rebanho (DE LIMA; STERZA, 2016). A produção *in vitro* de embriões (PIVE) se encaixa como uma biotécnica importante para esse avanço, viabilizando a diminuição do intervalo entre gerações (fêmeas a partir de dois meses de idade), permitindo a introdução/intensificação do uso do material genético de fêmeas identificadas como geneticamente superiores. Além disso, pode-se destacar a obtenção de embriões de fêmeas que são incapazes de produzirem descendentes por meio de técnicas convencionais (MELLO et al., 2016). Outra característica ligada a PIVE é possibilidade de otimizar o uso do material genético de machos, permitindo a produção de diversos embriões com o uso de uma única palheta de sêmen além do uso de touros diferentes para uma única doadora (BRACKETT; ZUELKE, 1993; SANTL et al., 1998; BUENO; BELTRAN, 2008).

Mesmo com os avanços relacionados a reprodução animal, essa biotécnica ainda possui desempenho insuficiente na produção de embriões, apenas 40% de oócitos atingem o estágio de blastocisto (LONERGAN; FAIR, 2008) em laboratórios comerciais e 30% em ambiente de pesquisa (MAPLETOFT, 2013). Nesse contexto, se faz necessário o desenvolvimento de estudos para encontrar novas alternativas e produtos para aumentar as taxas de produção na PIVE e melhorar a qualidade dos blastocistos.

Muitos fatores podem prejudicar o desenvolvimento dos embriões durante a PIVE, tais como: meio de cultivo, atmosfera gasosa, tensão de oxigênio e presença de agentes químicos. (LONERGAN; FAIR, 2008; RODRIGUES, 2009). Outra desvantagem que impede melhores resultados da PIVE é o conteúdo citoplasmático e as alterações no oócito, como mudanças bioquímicas, estruturais e citoesqueléticas, que acontecem durante o processo de crescimento até o reinício da meiose, que são de extrema importância para a fecundação e o desenvolvimento embrionário (LI e ALBERTINI, 2013).

O estresse oxidativo está diretamente relacionado a tensão de oxigênio, porém, pode ser amenizado com o uso de antioxidantes como o resveratrol durante a maturação oocitária. Os antioxidantes são substâncias que atrasam ou previnem a oxidação em água, evitando a produção em excesso das mesmas (LUZ ET AL., 2011).

É sabido que o estresse oxidativo influencia a eficiência da PIVE. O resultado desse estresse pode causar alterações negativas nos processos de maturação e fecundação dos oócitos e também no cultivo dos prováveis embriões. Para que isso não aconteça, é necessário diminuir a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) ou aumentar utilização de substâncias antioxidantes (ANDRADE et al., 2010).

A nanotecnologia pode ser usada para o desenvolvimento de novos produtos veterinários e tem como grande vantagem a possibilidade de aumentar a biodisponibilidade de compostos bioativos para a obtenção de melhores resultados (MADUREIRA, 2011). Segundo BRANDÃO et al. (2011), a prática da associação de um composto bioativo à sistemas nanoestruturados pode resultar no uso racional destes compostos pois o número de doses e a concentração podem ser reduzidas durante o tratamento. Sendo assim, a associação da nanopartícula ao resveratrol pode ser uma opção interessante para a produção *in vitro* de embriões.

Portanto, a proposta de utilização de substâncias antioxidantes se encaixa nesse contexto como uma ferramenta promissora para aumentar esses números. Esse sistema de produção visa diminuir os danos causados por essas substâncias utilizando antioxidantes como o Resveratrol sozinho ou associado a nanopartículas. Alguns trabalhos já apresentam resultados significativos com essa substância, porém novos estudos são necessários para aprimorar e contribuir para o aumento da produtividade do sistema convencional.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção *in vitro* de embrião

Grande parte do aumento da produtividade de rebanhos bovinos tem sido atribuído, principalmente, a intensa seleção de características produtivas com utilização de biotécnicas de manejo. Sendo assim, a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), transferência de embriões (TE) e produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem sido aperfeiçoada com objetivo de maximizar o potencial reprodutivo das fêmeas e melhorar cada vez mais esses índices (BURATINI JR., 2006). Dentre essas biotécnicas, destaca-se a PIVE que tem como uma de suas vantagens a utilização de animais jovens com objetivo de diminuir o intervalo de gerações e aumentar o ganho genético (VARAGO et al., 2008). Portanto, um dos principais objetivos da PIVE se dá na obtenção de embriões viáveis a partir de fêmeas saudáveis de alto valor genético.

A PIVE é composta por três etapas: maturação *in vitro* de oócitos (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* de embriões (CIV). Na maturação ocorre várias mudanças no citoplasma e no núcleo do oócito devido aos estímulos provenientes do meio para possibilitar a fecundação e alcançar o estágio de blastocisto (DADARWAL et al., 2015). As células da granulosa e do *cumulus oophorus* tem um papel importante para o oócito durante a maturação *in vitro*, sendo fundamentais na aquisição da competência do oócito para ser fecundado e se desenvolver (STAIGMILLER e MOOR, 1984). Sendo assim, trabalhos mostraram que oócitos com *cumulus* expandido após a fecundação *in vitro*, apresentou maiores taxa de clivagem quando comparado a oócitos sem as células do *cumulus* ou com o *cumulus* compacto (SIRARD e LAMBERT 1985, 1986; HYTTEL ET AL., 1986).

É somente após a finalização da maturação citoplasmática e nuclear, que o oócito se torna apto a ser fecundado e iniciar o desenvolvimento embrionário. Quando esse processo ocorre de forma inadequada no núcleo ou citoplasma, a fecundação é impossibilitada de ocorrer adequadamente, aumentando a incidência de polispermia e bloqueando o desenvolvimento embrionário (MINGOTI, 2005). Sendo assim, a maturação é um importante processo que necessita de uma atenção especial além do desenvolvimento de sistemas *in vitro* eficientes que possibilitam o crescimento do oócito para garantir o sucesso nas etapas seguintes (CHAVES et al., 2010).

A fecundação se refere ao processo no qual o espermatozoide entra em contato com o oócito, gerando o zigoto. No processo *in vivo*, esses espermatozoides precisam chegar até a ampola da tuba uterina para fecundar o oócito, sendo fundamental a presença de substâncias no sistema reprodutor feminino para que ocorra capacitação dos espermatozoides. As alterações relacionadas a capacitação espermática incluem modificação bioquímica, como fluidez e teor lipídico da membrana plasmática, tendo como consequência uma hiperativação espermática. Dessa forma, torna-se possível a interação da membrana do espermatozoide a receptores específicos da zona pelúcida do oócito para ocorrer a reação acrossômica. Já no processo *in vitro*, para que ocorra esse processo é necessário a utilização de protocolos para fornecer, no meio usado, um ambiente adequado e possibilitar a perfeita interação do espermatozoide com o oócito afim de completar a fecundação (YANG et al., 1993; ASSUMPCÃO et al., 2002; GONÇALVES et al., 2007).

Após a fecundação, os embriões no estágio de uma célula ou zigoto são transferidos para o meio de cultivo, permanecendo por sete dias até atingirem o estágio de blastocisto, momento no qual podem ser transferidos para o útero de fêmeas receptoras que darão início a gestação (DODE et al., 2000). Um dos fatores mais importantes para que os embriões

produzidos *in vitro* cheguem ao estágio de blastocisto, é a qualidade oocitária, porém o meio de cultivo também se faz importante, influenciando principalmente a qualidade dos embriões (LONERGAN et al., 2003). A ativação do genoma embrionário, processo de divisão celular, compactação dos blastômeros no estágio de mórula e início da diferenciação embrionária com a formação da blastocele ocorrem durante esse período de desenvolvimento pré-implantação (HOSHI, 2003). Sendo assim, muitos protocolos têm sido testados durante essa fase de desenvolvimento embrionário (GALLI, 1996).

As condições de cultivo *in vitro*, como dito anteriormente, são determinantes para que haja bons índices de produção de embriões, portanto muitos estudos são feitos visando avaliar o efeito de diferentes fatores, intrínsecos e extrínsecos, sobre a capacidade de desenvolvimento desses embriões, como por exemplo a composição dos meios de cultivo, condições de temperatura e atmosfera gasosa, adição de aminoácidos, vitaminas, macromoléculas e fatores de crescimento assim como o uso de soro (NAGAI, 2001).

2.2 Produção de espécies reativas do oxigênio e o estresse oxidativo

As espécies reativas do oxigênio (ROS) são moléculas instáveis derivadas do oxigênio que apresentam elétrons não pareados na sua orbita mais externa, permitindo que interajam com outras moléculas. Quando estas moléculas recebem elétrons, exercem a função de agentes oxidantes, ou agentes redutores quando doam elétrons (AGARWAL et al., 2005).

O estresse oxidativo é um fator que influencia diretamente no processo de maturação oocitária e conseqüentemente, interfere na produção e qualidade embrionária nas etapas subsequentes. O excesso na produção de espécies reativas do oxigênio gera injúrias celulares (Andrade et al., 2010). O metabolismo celular e as condições ambientais às quais os oócitos e embriões são submetidos durante a PIVE pode favorecer o estresse oxidativo. Entre as condições citadas, pode-se destacar a concentração de oxigênio, presença de espermatozoides, exposição à luz ou ao calor e também os componentes do meio (GUÉRIN et al., 2001).

Para que as espécies reativas do oxigênio se tornem estáveis é necessário que elas adquiram elétrons. Assim sendo, podem reagir com qualquer outra molécula que está ao seu redor como por exemplo lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos, tendo como consequência uma oxidação. Com isso, reações em cadeia são desencadeadas gerando alterações mitocondriais, desnaturação proteica, peroxidação lipídica além do bloqueio no desenvolvimento embrionário podendo ocorrer também apoptose celular (AGARWAL et al., 2005; GUÉRIN et al., 2001).

A produção de uma quantidade mínima de ROS é importante para que o funcionamento do organismo ocorra de forma adequada pois estão envolvidos no transporte de elétrons na cadeia respiratória e atua como moléculas sinalizadoras. Porém, esse efeito pode se tornar prejudicial quando há uma produção anormal de ROS e diminui a liberação de agentes antioxidantes (DOWNLING E SIMMONS, 2009).

O ROS está envolvido em muitos processos celulares como a proliferação celular, adaptação a processos de hipóxia celular e até mesmo no processo apoptótico (DRÖGE, 2003). Também, pode estar ligado ao processo de manutenção ou reestabelecimento da homeostase, agindo como mensageiros intracelulares secundários e moduladores de sinais de transdução (CHANDEL e SCHUMACKER, 2000).

Os principais ROS encontrados no cultivo de embriões são os radicais ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila (OH^-). Quando há um desequilíbrio favorecendo a produção desses elementos, ocorre o estresse oxidativo. Esse estresse é capaz de causar danos ao DNA, às proteínas e aos lipídeos, gerando problemas e diminuindo a eficácia da produção *in vitro* de embriões (ANDRADE et al., 2010; SILVA et al., 2011).

3.3 Resveratrol

Muitas substâncias antioxidantes têm sido testadas com o objetivo de aprimorar resultados na produção *in vitro* de embriões, e muitas vezes, essas substâncias apresentam resultados positivos. Estudos demonstraram isso com a utilização de resveratrol na maturação de oócitos bovinos (WANG et al., 2014).

O resveratrol é um antioxidante encontrado em plantas que tem um papel importante no metabolismo celular. Atua na remoção de radicais superóxidos, na redução da produção de espécies reativas do oxigênio, participa da inibição de peroxidação lipídica e tem um papel importante na expressão de enzimas e co-fatores antioxidantes (PERVAIZ & HOLME, 2009).

Durante a produção *in vitro* de embriões os oócitos e os embriões são submetidos a maiores concentrações de oxigênio quando comparado aos produzidos *in vivo*, fazendo com que haja uma maior produção de espécies reativas do oxigênio, causando dano celular e podendo ter como consequência perda de suas funções (YANG ET AL., 1998). Além disso, a produção intermitente de espécies reativas do oxigênio associada à deficiência da concentração de glutatona são as principais causas de baixa eficiência da PIVE em diversas espécies (AGARWAL et al., 2005; LUBERDA, 2005). Portanto a utilização do resveratrol na

maturação oocitária parece ser interessante, já que esse composto confere resistência em relação à disfunção mitocondrial, também está relacionado com a inibição da apoptose e aumento do nível intracelular de enzimas antioxidantes como a glutatona (ROBB et al., 2008). Ainda, esse antioxidante está ligado à manutenção de ciclos estrais regulares, melhora na quantidade e qualidade de oócitos, aumento da expressão de genes relacionados com a luteinização e aumento na secreção de progesterona (KONG et al., 2011; LIU et al., 2013. MORITA et al., 2012).

Um fator importante foi relatado por Wang et al (2014) quando demonstraram que a suplementação com 1 μ M de resveratrol na MIV aumentou a secreção de progesterona e diminuiu a de estradiol pelas células do *cummulus*. Também, observaram uma melhor expansão do *cummulus* na maturação oocitária favorecendo a produção de blastocistos.

Portanto, o resveratrol é um potente antioxidante que pode levar a melhoria da atividade biológica. Problemas nas condições de cultura *in vitro* podem acarretar desenvolvimento anormal do embrião sendo observado uma baixa frequência da formação de blastocistos que geralmente apresentam células reduzidas, podendo afetar a vida fetal e pós-natal (DURANTHON et al., 2008). Sendo assim, é necessário a otimização de um sistema de cultivo *in vitro* para melhorar a viabilidade do embrião (SALZANO et al. 2014).

2.4 Nanopartículas

As nanopartículas podem ser definidas como partículas ou material de tamanho inferior a 100nm, que podem ser carreadoras por possuírem a capacidade de se ligar a outras substâncias. Sendo assim, podem ser utilizadas para realização de pesquisas por potencializar o efeito de alguns fármacos e minimizar a liberação de determinadas substâncias (KREUTER, 2007).

As nanopartículas mesoporosas de sílica (poros de tamanho entre 2 e 50nm) podem ser usadas para encapsular moléculas ou transportar medicamentos (HAO, LI, TANG; 2016). Além disso, são biocompatíveis, possuem grande volume de poros e área de superfície, aumentam a solubilidade de drogas e a cinética de liberação dos fármacos e também possuem grande capacidade de se ligar a outras substâncias (SANTOS et al., 2013).

A utilização de nanopartículas parece ser uma opção viável para aumentar a eficácia do resveratrol já que elas são responsáveis pela liberação gradativa e lenta das substâncias que

estão ligadas, sendo interessante para o uso na PIVE, pois o uso de antioxidantes em altas concentrações pode ser prejudicial para o processo (WANG et al., 2002).

3. OBJETIVO

Objetivou-se avaliar os efeitos do resveratrol ligado a nanopartículas como antioxidantes durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos na taxa de clivagem e de blastocistos.

4. METODOLOGIA

4.1 Reagentes

Os reagentes utilizados neste estudo foram provenientes da Sigma (Sto Louis MO, USA), a menos que indicado de outra forma.

4.2 Local e Animais

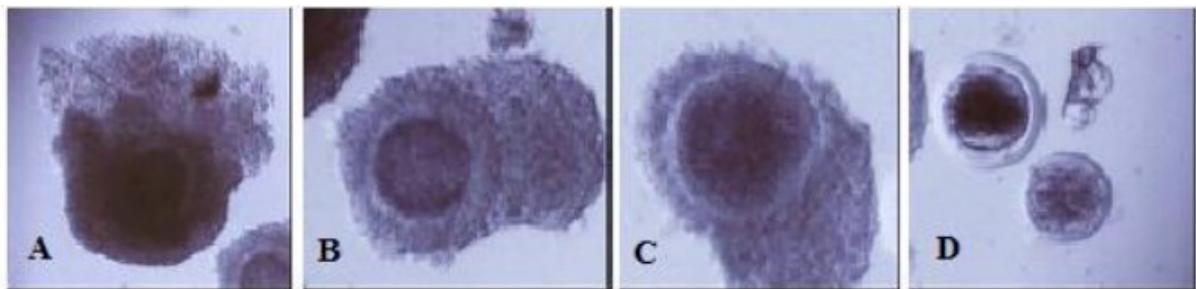
Os ovários usados nesse experimento foram coletados de vacas em abatedouro-frigorífico no município de Uberlândia-MG, variando a raça, idade e peso dos animais. O transporte ocorreu em garrafa térmica e o tempo não ultrapassou o período de quatro horas, sendo a temperatura mantida entre 35°C e 38°C. Os ovários foram aquecidos com solução fisiológica a 0.9% para manter a temperatura adequada e levados ao Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia.

4.3 Obtenção e seleção dos complexos *cumulus-oócitos* (COCs)

Após a chegada dos ovários, eles foram lavados por três vezes em NaCl 0,9% estéril e os folículos ovarianos que apresentaram diâmetro de 3-8mm foram puncionados com a utilização de uma seringa descartável de 10 ou 20 mL acoplado a uma agulha 40 x 1,2 (18G). Sendo assim, o fluido folicular obtido foi depositado em tubos plásticos de 15mL e deixado em repouso em banho maria (35°C à 38°C) por 10 minutos até a sedimentação. Logo após, iniciou-se o processo de rastreamento dos oócitos com a utilização de um microscópio estereoscópico (Olympus Optical®, modelo SZ-40/SZ-ST).

A classificação dos complexos *cumulus-oócitos* (COCs) foi realizada segundo Leibfried e First (1979) sendo Grau I: oócitos com *cumulus* compacto e mais de três camadas de células (Figura 1A); Grau II: oócitos apresentando menos de três camadas de células do *cumulus oophorus* e ooplasma com granulações levemente heterogêneas (Figura 1B), Grau III: oócitos com *cumulus* presente mas mostrando remoção das células do *cumulus* em menos de um terço da superfície da zona pelúcida (Figura 1C), e Grau IV: oócitos sem a presença de células do *cumulus*, completamente desnudos e atrésicos (Figura 1D). Os COCs classificados em Grau I e II seguiram para a etapa de maturação *in vitro* (MIV).

Figura 1. Classificação dos complexos *cumulus-oócitos*



Fonte: Penitente Filho, Oliveira, & Torres, 2012. p. 13.

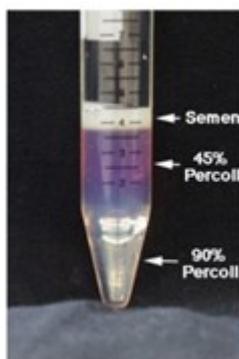
4.4 Maturação *in vitro* (MIV)

Os oócitos seguiram para a etapa de maturação *in vitro* (MIV), divididos de acordo com os tratamentos, sendo eles controle (sem antioxidante), resveratrol 1 μM , resveratrol 0,5 μM , nano 1 μM e nano 0,5 μM . Foram lavados uma vez em meio de lavagem - base TCM-199 Hepar acrescentada de 10 % de soro fetal bovino, solução de piruvato (0,11 mg/mL) e amicacina (83 mg/mL). Após este processo, os oócitos foram lavados duas vezes em meio base de maturação já contendo o tratamento citado para cada grupo, sendo esse meio constituído de base TCM-199 Bicarbonato acrescentada de 10% de soro fetal bovino (0,11 mg/mL), amicacina (83 mg/mL), piruvato de sódio (22 $\mu\text{g/mL}$), FSH (0,5 $\mu\text{g/mL}$), LH (5 $\mu\text{g/mL}$) mais o tratamento e seguiram normalmente para a placa de MIV, sendo distribuídos em gotas de 100 μL do meio de maturação com o tratamento específico utilizado sob óleo mineral e então incubados em estufa a 38,5°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 durante 22 a 24 horas. Depois desse período, foi analisado a expansão das células do *cumulus* utilizando um microscópio estereoscópico, indicando assim, a maturação oocitária.

4.5 Fecundação *in vitro* (FIV)

Os oócitos foram lavados em duas gotas do meio TALP-FERT acrescido de amicacina (83 mg/mL), solução de piruvato (0,11 mg/mL), PHE (2 μ M penicilamina, 1 μ M hipotaurina, 1 μ M epinefrina), heparina (10 μ g/mL) e albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos essenciais (6 mg/mL), passados para a placa de FIV em gotas de 100 μ L desse mesmo meio. Nessa fase já não há tratamento, porém os oócitos foram separados na placa FIV de acordo com o tratamento que receberam na MIV para que posteriormente pudesse ser feita a análise individual de cada grupo tratado. A fecundação foi realizada com sêmen selecionado do mesmo touro para todas as réplicas. As palhetas de sêmen foram descongeladas, foi feita uma avaliação inicial da motilidade e vigor dos espermatozoides e então eles foram submetidos ao processo de seleção e capacitação pelo método de centrifugação com gradientes descontínuos de Percoll® adaptado de Parrish et al. (1995), que consiste na adição de 1000 μ L de Percoll 90% e 1000 μ L de Percoll 45% em um tubo de 15mL depositando então o sêmen sobre o gradiente (Figura 2). Esse tubo foi levado a centrífuga sob rotação de 2400rpm durante 30 minutos. Os espermatozoides que conseguiram atravessar o gradiente de percoll chegando então ao final do tubo foram considerados aptos para fecundação. Com o fim da capacitação, foi avaliada a motilidade e vigor desses espermatozoides, além da concentração por contagem em câmara de Neubauer com o auxílio de um microscópio de luz. Esses parâmetros são fundamentais para que seja calculada a quantidade de meio TALP-FERT que deve ser acrescido no sêmen para que a dose inseminante utilizada (4 μ L) tenha uma concentração de 25×10^6 espermatozoides/mL. Sendo assim o dia da FIV foi considerado como o dia 0 (D0) do desenvolvimento embrionário. Os COCs juntamente com os espermatozoides foram levados para a estufa por 12 a 18 horas nas mesmas condições da maturação.

Figura 2. Gradiente de percoll



Fonte: Generar, gradiente de percoll.

4.6 Cultivo *in vitro* (CIV)

Finalizado o período da FIV os possíveis zigotos foram desnudos, ou seja, foi retirado as células do *cumulus*. Esse processo é importante pois a partir desse momento elas podem competir com os zigotos por nutrientes do meio. É importante ressaltar que nessa fase também não há presença de tratamento. Portanto, os zigotos foram lavados em meio com base SOF (SyntheticOviductFluid) suplementado com solução de piruvato (0,11 mg/mL), amicacina (83 mg/mL), BSA livre de ácidos graxos e baixa endotoxina (6 mg/mL) e soro fetal bovino (2,5%) e transferidos para a placa de cultivo CIV seguindo a mesma separação de gotas/tratamento que receberam na MIV em gotas de 100 µL do meio com base SOF e incubados a 38,5°C em atmosfera úmida contendo 5% de gás carbônico durante sete dias. Quarenta e oito horas após a fecundação foi contado o número de estruturas que se dividiram (taxa de clivagem) e sete dias depois foi avaliado o número de embriões que conseguiram se desenvolver chegando até o estágio de blastocistos (taxa de blastocisto).

4.7 Análise estatística

Os dados foram analisados por regressão logística no programa MINITAB, sendo incluído no modelo o efeito de tratamento. A significância estatística foi estabelecida como $P \leq 0,05$ e a tendência estatística como $0,05 < P \leq 0,10$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi detectado efeito de tratamento do grupo Resveratrol 1 μ M na taxa de clivagem, porém a taxa de blastocisto apenas tendeu a ser menor que nos demais grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Taxa de clivagem e de blastocisto de embriões bovinos de acordo com o tratamento sendo n o número de oócitos utilizados em cada grupo.

Tratamento (n)	Taxa de Clivagem (%)	Taxa de Blastocisto (%)
Controle (134)	85,82 ^a	41,04 ^x
Resveratrol 1 μ M (131)	41,22 ^b	11,45 ^y
Resveratrol 0,5 μ M (136)	84,56 ^a	29,41 ^x
Nano 1 μ M (131)	83,97 ^a	44,27 ^x
Nano 0,5 μ M (133)	82,71 ^a	36,09 ^x
Valor de P	0,003	0,083

No processo de produção *in vitro* de embriões bovinos, aproximadamente 90% dos oócitos são capazes de atingir a maturação nuclear, caracterizada pela mudança da prófase I a metáfase II, e cerca de 80% dos que são fertilizados concluem no mínimo o segundo ciclo celular (GORDON, 1994). Porém, apenas 30% a 40% dos oócitos fertilizados dão origem a embriões que eventualmente alcançam o estágio de blastocisto (LONERGAN et al., 2003).

No presente experimento, a adição de antioxidante resveratrol ligado ou não a nanopartículas de sílica ao meio de maturação de oócitos não demonstrou ser vantajoso ao se analisar a taxa de clivagem e taxa de blastocisto quando comparado ao grupo controle sem antioxidante. Porém, muitos estudos retratam o antioxidante como elemento fundamental para a maturação de oócitos, especificamente na maturação citoplasmática, que é necessária para o desenvolvimento embrionário (FURNUS et al., 2008; SILVA, et al., 2011).

Ao se analisar os dados obtidos, foi possível observar que a menor taxa de clivagem e a tendência de menor taxa de blastocisto foi no grupo Resveratrol 1,0 μ M, ou seja, em maior concentração do antioxidante em solução, sugerindo que a utilização do resveratrol em altas concentrações pode ser prejudicial ao desenvolvimento do embrião. O desenvolvimento de blastocistos pode ser influenciado negativamente pelo uso de antioxidantes durante a MIV (GUERIN et al., 2001) pois a formação equilibrada de espécies reativas do oxigênio exerce

um papel metabólico fundamental na maturação oocitária e no desenvolvimento de blastocistos (SABATINI et al., 1999).

Porém, a utilização do resveratrol em doses pequenas na maturação de oócitos leva a uma maior expressão de genes que codifica enzimas antioxidantes como a catalase e superóxido dismutase 1, além de uma menor expressão de genes relacionados a apoptose, aumentando assim, a taxa de blastocisto, melhorando a qualidade dos oócitos e o desenvolvimento e competência dos blastocistos (WANG et al., 2019). No presente estudo a adição de resveratrol em menor concentração e ou ligado a nanopartículas de sílica em maior concentração não alterou a produção de blastocisto em relação ao controle, mas pode ter alterado a qualidade dos mesmos.

Nesse experimento, o uso do resveratrol ligado a nanopartículas de sílica na concentração 1,0 μM apresentou taxa de clivagem igual ao grupo controle, ao Resveratrol 0,5 μM e ao Nano 0,5 μM , porém se for desconsiderado a significância estatística, nota-se que esse grupo apresentou a maior taxa de blastocisto mesmo em maior concentração, sugerindo que a nanopartícula de sílica seja uma opção viável para aumentar a eficácia do resveratrol por liberá-lo de forma gradativa e lenta, já que esse composto tem como característica ser instável, apresentar baixa disponibilidade e solubilidade fazendo com que a viabilidade do seu uso em maiores concentrações seja reduzida (WANG et al., 2002; KIM et al., 2009).

Nesse contexto, a busca por mecanismos que otimizem o uso desse composto se faz importante já que o estresse oxidativo decorrente da PIVE é inevitável, e que, a grande quantidade de espécies reativas do oxigênio pode ser neutralizado através da suplementação dos meios de cultivo com antioxidantes (TRINDADE et al., 2016).

6. CONCLUSÃO

A suplementação de resveratrol na maturação oocitária nas concentrações 0,5 μM e resveratrol ligado a nanopartícula nas concentrações de 0,5 μM e 1,0 μM não demonstraram resultados que justifiquem sua utilização pois a taxa de clivagem e de blastocisto foi a mesma quando comparado com o grupo sem tratamento. Porém quando o resveratrol foi utilizado na concentração de 1,0 μM a taxa de clivagem reduziu e tendeu a reduzir a taxa de blastocisto. Portanto, deve-se realizar análises da qualidade dos embriões produzidos para que a resposta quanto a utilização ou não do resveratrol na maturação seja mais fidedigna, considerando não apenas a taxa de clivagem e taxa de blastocisto. Além disso, as nanopartículas de sílica

demonstraram ser eficientes quando utilizadas em associação com um composto instável como o resveratrol, já que este, mesmo em maior concentração, não causou prejuízo na produção *in vitro* de embriões.

REFÊRENCIAS

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 3, n. 1, p. 28, 2005.

ALVES, K. A. et al. The mare model to study the effects of ovarian dynamics on preantral follicle features. **PloSone**, v. 11, n. 2, p. e0149693, 2016.

ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.

ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de reprodução animal**, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.

ASSUMPÇÃO M. E. O. D., HAIPECK K., LIMA A. L., MELLO M. R. B., OLIVEIRA L. J., OLIVEIRA V.P., TAVARES L. M. T., VISINTIN J. A., Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.39, p.149-156, 2002.

BRACKETT, R. G.; ZUELKE, K. A. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.39, p.43-64, 1993.

BRANDÃO, H.M.; GERN J.C.; VICENTINI, N.M.; PEREIRA, M.M.; ANDRADE, P.V.D. Nanotecnologia: a próxima revolução na agropecuária. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, ano XVII, v.53, p.61-67, 2011.

BUENO, A. P.; BELTRAN, M. P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n.11, p.1-7, 2008.

BURATINI Jr J., Foliculogênese em bovinos. In: II Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, 2006, Londrina, PR. **Anais...** Londrina: UEL, 2006. p.55-62.

CHANDEL, N. S.; SCHUMACKER, P. T. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. **Journal of Applied Physiology**, v. 88, p. 1880-1889, 2000.

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

DE LIMA, A. C. B.; STERZA, F. M. A produção *in vitro* de embriões de genética especializada da raça girolando. **Anais do Semex**, n. 8, 2016.

DRÖGE, W. Oxidative stress and aging. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 543, p. 191-200, 2003.

FURNUS, C.; DE MATOS, D.G.; PICCO, S. et al. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during *in vitro* maturation of cattle oocytes. **Anim. Reprod. Sci.**, v.109, p.88-99, 2008.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects 01IVM-IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.371-379, 1996.

GENERAR, gradiente de percoll. Disponível em: <<http://generar.com.br/exames/attachment/03/#lg=1&slide=0>> Acessado em: 27/11/2019.

GONÇALVES P.B.D., BARRETA M.B., SANDRI L.R., FERREIRA R., ANTONIAZZI A.Q.; Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.212-217, 2007.

GONÇALVES, P. B. D. et al. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.212-217, 2007.

GORDON, I. Culturing the early embryo. In: GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. Dublin: CAB International, p. 227-292, 1994.

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, n. 2, p. 175-189, 2001.

HAO, N.; LI, L.; TANG, F. Shape matters when engineering mesoporous silica-based nanomedicines, **Biomaterials Science**, v. 4, n. 4, p. 575–591, 2016.

KIM, B. K.; LEE, J. S.; OH, J. K.; PARK, D. J. Preparation of resveratrol-loaded poly (caprolactone) nanoparticles by oil-in-water emulsion solvent evaporation method. **Food Science and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 157-161, 2009.

KONG, X. X.; FU, Y. C.; XU, J.J.; ZHUANG, X. L.; CHEN, Z, G.; LUO, L. L. Resveratrol, an effective regulator of ovarian development and oocyte apoptosis. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 34, n. 11, p. 374-381, 2011.

KREUTER, J. Nanoparticles-a historical perspective. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, n. 1, p. 1-10, 2007.

LIU,M.; YIN, Y.; YE, X.; ZENG, M.; ZHAO, Q.; KEEFE, D. L.; LIU, L. Resveratrol protects against age-associated infertility in mice. **Human Reproduction**, v. 28, n. 3, p. 707-717, 2013.

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

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; MOREIRA, P.M.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P. Divergence of gene expression in bovine zygotes cultured to the blastocyst stage in vivo or in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1424-31, 2003.

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**, Kortowo, v. 5, n. 1, p. 5-17, mar. 2005.

LUZ, H. K. M.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A. P. R. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 1-13, 2011.

MADUREIRA, E.H. Entrevista sobre desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas para uso veterinário, incluindo emprego de micro e nanopartículas. Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária, Ano XVII, v.53, p.5-8. 2011.

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

MELLO, R. R. C. et al. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 2, p. 58-64, 2016.

MINGOTI GZ. Aspectos técnicos da produção *in vitro* de embriões bovinos. In: Tópicos Avançados em Biotecnologia da Reprodução, 2005, Jaboticabal, SP. Jaboticabal, SP: Funep, 2005. CD-ROM.

MORITA, Y.; WADA-HIRAIKE, O.; YANO, T.; SHIRANE, A.; HIRANO, M.; HIRAIKE, H.; KOYAMA, S.; OISHI, H.; YOSHINO, O.; MIYAMOTO, Y.; SONE, K.; ODA, K.; NAKAGAWA, S.; TSUTSUI, K.; TAKETANI, Y. Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 14, p. 1-10, 2012.

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

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Epigenetic reprogramming in early embryonic development: effects of in-vitro production and somatic nuclear transfer. **Reproductive Bio Medicine Online**, v.7, n. 6, p.649-56, 2003.

PARK, S. J. et al. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. **Cell**, Bethesda, v. 148, n. 3, p. 421-433.

PENITENTE FILHO, J. M., OLIVEIRA, F. A., & TORRES, C. A. A. (2012). Produção De Embriões Bovinos *in vivo* e *in vitro*.; (May 2014), p. 13. <https://doi.org/10.13140/2.1.3981.7928>.

PERVAIZ, S.; HOLME, A. L. Resveratrol: its biologic targets and functional activity. **Antioxidants & Redox Signaling, Singapore**, v. 11, n. 11, p. 2851-2897, nov. 2009.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of

serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 236-243, 2003.

ROBB, E. L.; PAGE, M. M.; WIENS, B. E.; STUART, J. A. Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 367, n. 2, p. 406-412, 2008.

SABATINI, L.; WILSON, C.; LOWER, A. et al. Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in vitro fertilization. **Fertil. Steril.**, v.72, p.1027-1034, 1999.

SALZANO, A.; ALBERO, G.; ZULLO, G.; NEGLIA, G.; ABDEL-WAHABB. A.; BIFULCOA, G.; ZICARELLI, L.; GASPARRINI, B. Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine in vitro produced embryos. **Animal Reproduction Science**, 2014.

SANTL, B. et al. Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in Simmental heifers. **Theriogenology**, v.50, p.89-100, 1998.

SANTOS, H. A.; PELTONEN, L.; LIMNELL, T.; HIRVONEN, J. Mesoporous materials and nanocrystals for enhancing the dissolution behavior of poorly water-soluble drugs. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 14, n. 10, p. 926-938, 2013.

SILVA, G. M.; ARAÚJO, V. R.; DUARTE, A. B. G.; LOPES, C. A.; FIGUEIREDO, J. R. Papel dos antioxidantes no cultivo in vitro de células ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 3, 2011. ISSN 0102-0803.

SILVA, G.M.; ARAÚJO, V.R.; DUARTE A.B.G. et al. Papel dos antioxidantes no cultivo in vitro de células ovarianas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.35, p.315-326, 2011.

Sirard MA, Lambert RD, Gray P. In vitro development of in vitro fertilized bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. **Anim Reprod Sci**, v.12, p.21-29, 1986.

Staigmiller RB, Moor RM. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside of the follicle. **Gamete Res**, v.9, p.221-229, 1984.

TRINDADE, M. C.; MACENTE, B. I, VICENTE, W. R. R.; APPARÍCIO, M. Estresse oxidativo na produção in vitro de embriões bovinos: revisão de literatura. **Revista Investigação**, v. 15, n. 1, p. 37-45, 2016.

VARAGO F. C., MENDONÇA L. F., LAGARES M.A., Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.100-109, 2008.

WANG, X.; FALCONE. T.; ATTARAN, M.; GOLDBERG, J. M.; AGARWAL, A. SHARMA, R. K. Vitamin c and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and sterility**, v. 78, n. 6, p. 1272-1277, 2002.

WANG, X.; ZHU, X.; LIANG, X.; XU, H.; LIAO, Y.; LU, K.; LU, S. Effects of resveratrol on in vitro maturation of porcine oocytes and subsequent early embryonic development following somatic cell nuclear transfer. **Reproduction in domestic animals**, p. 1-11, 2019.

YANG X., JIANG S., FOOTE R.H., Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. **Mol Reprod Devel**, v.34, p.94-100, 1993.

YANG, H.W.; HWANG, K.J.; KWON, H.C. et al. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. **Hum. Reprod.**, v.13, p.998-1002, 1998.