

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

SORAIA RAGE REZENDE

Efeito do uso do resveratrol associado à nanopartículas de sílica durante a maturação *in vitro*  
de ovócitos bovinos

Uberlândia  
2020

SORAIA RAGE REZENDE

Efeito do uso do resveratrol associado à nanopartículas de sílica durante a maturação *in vitro*  
de ovócitos bovinos

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Produção animal

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

Uberlândia  
2020

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

R467 2020	<p>Rezende, Soraia Rage, 1992- EFEITO DO USO DO RESVERATROL ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS DE SILÍCA DURANTE A MATURAÇÃO IN VITRO DE OVÓCITOS BOVINOS [recurso eletrônico] / Soraia Rage Rezende. - 2020.</p> <p>Orientadora: Ricarda Maria dos Santos. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.277">http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.277</a> Inclui bibliografia.</p> <p>1. Veterinária. I. Santos, Ricarda Maria dos, 1972-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 619</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**  
 Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências  
 Veterinárias  
 BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufubr



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências Veterinárias				
Defesa de:	DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO Nº PPGCV/007/2020				
Data:	04 de março de 2020	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	16:30
Matrícula do Discente:	11812MEV011				
Nome do Discente:	SORAIA RAGE REZENDE				
Título do Trabalho:	EFEITO DO USO DO RESVERATROL ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS DE SILÍCA DURANTE A MATURAÇÃO IN VITRO DE OVÓCITOS BOVINOS				
Área de concentração:	PRODUÇÃO ANIMAL				
Linha de pesquisa:	BIOTÉCNICAS E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DOS REBANHOS BOVINOS				

Reuniu-se no Laboratório de Reprodução Animal, bloco 2D, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Giovanna Faria de Moraes - Médica Veterinária Autônoma; Kele Amaral Alves - Médica Veterinária Autônoma; Ricarda Maria dos Santos orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Ricarda Maria dos Santos, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz 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, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Ricarda Maria dos Santos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 05/03/2020, às 08:46, 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 **Giovanna Faria de Moraes, Usuário Externo**, em 05/03/2020, às 11:05, 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 **Kele Amaral Alves, Usuário Externo**, em 09/03/2020, às 14:06, 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](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1897868** e o código CRC **FA62A761**.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, sabedoria, coragem e por nunca ter me deixado faltar forças para correr atrás dos meus sonhos.

A minha família, em especial meus pais, minha Vó e meu Vô que sempre fizeram dos meus sonhos os deles e são meu suporte e exemplo de coragem, determinação e fé, sem vocês eu não teria chegado a lugar nenhum.

A Universidade Federal de Uberlândia e todo seu corpo docente, que sempre me incentivou a buscar conhecimento.

A equipe do laboratório de reprodução animal da UFU, em especial a Graciele e Mayara, Kely e todos os alunos de graduação que contribuíram para a realização do projeto, sem a ajuda e conhecimento de vocês nada seria possível.

A Professora Dra. Ricarda Maria dos Santos, por quem tenho grande respeito e admiração agradeço pela oportunidade e pela confiança depositada em mim.

À equipe do Frigorífico Luciana pela colaboração e pela disponibilidade de coleta de material para que o experimento pudesse ter sido realizado.

Aos amigos que sempre me deram força para que eu nunca desistisse dos meus sonhos. Aqueles que estão do meu lado há muito tempo, Paula, Amanda Lima, Mayra, Gabriela, Kamila, Oglênia, que me acompanham e estão do meu lado desde a época da graduação e também aqueles que tiveram o privilégio de conhecer durante o mestrado, Roberta Braz, Raphaella, Carol e tantos outros que fizeram com que a caminhada até aqui fosse mais leve, não tenho palavras para expressar o carinho que tenho por vocês.

Em falando de amigos não poderia deixar de citar aqueles que se tornam nossa família. Kalita Michelle, minha irmã de coração e toda sua família, Regina, Dida, Elen, Vó Celina, Vó Nilda, Vô Euripedes essa conquista não é só minha, é de todos vocês que nunca desistiram de estar do meu lado. Muito obrigada pelo carinho que sempre tiveram por mim. A Aline e Sidão que também sempre fizeram parte dessa família.

À coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

## RESUMO

Durante a produção *in vitro* de embriões, a maturação ovocitária pode ser influenciada pelo estresse oxidativo. Assim, é importante conhecer os meios para controlar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROs). Objetivou-se avaliar o uso do resveratrol associado a nanopartículas de sílica durante a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos. Ovários bovinos foram coletados em frigorífico comercial e os ovócitos foram distribuídos nos seguintes tratamentos durante o processo de maturação: controle, resveratrol 0,5  $\mu\text{M}$ , resveratrol 1  $\mu\text{M}$ , resveratrol ligado a nanopartículas 0,5  $\mu\text{M}$  e resveratrol ligado a nanopartículas 1  $\mu\text{M}$ . Foram avaliadas as taxas de clivagem e produção de blastocistos, produção de ROs, maturação nuclear ovocitária e apoptose celular. Para mensurar a taxa de produção foram utilizados 789 ovócitos e a análise de ROs e maturação nuclear através das probes 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetato (DCFDA) e 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI), respectivamente, com 130 e 95 ovócitos. A taxa de apoptose celular embrionária foi feita em 117 embriões, através do iodeto de propídio. A análise estatística foi realizada pelo programa Sigma Plot versão 11 e os dados foram considerados significativos quando  $P < 0,05$  (bilateral). O uso do resveratrol na forma diluída na concentração de 1  $\mu\text{M}$  diminuiu a taxa de clivagem e de blastocistos e não foi detectada diferença entre os tratamentos em relação a produção de ROs, maturação ovocitária e apoptose celular. O resveratrol quando associado a nanopartículas de sílica apresenta um melhor resultado para a taxa de clivagem e blastocistos em relação a forma diluída na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , o que pode estar relacionado a uma diminuição da toxicidade do antioxidante, devido a liberação controlada quando o mesmo está associado a estes nanomateriais.

**Palavras-chave:** Antioxidantes. Embriões. Espécies reativas de oxigênio. *Estresse* oxidativo. Produção *in vitro* de embriões.

## ABSTRACT

During the *in vitro* embryo production, the oocyte maturation may be influenced by oxidative stress. This way, it is important to know the means of controlling the production of oxygen reactive species (ROs). The aim of this study was to evaluate the use of resveratrol associated to nanoparticles of silica during the *in vitro* maturation of bovine oocytes. We collected bovine ovaries in regional slaughterhouses and the oocytes were distributed during the maturation process in the following treatments: control group, resveratrol 0.5  $\mu\text{M}$ , resveratrol 1  $\mu\text{M}$ , resveratrol connected to nanoparticles 0.5  $\mu\text{M}$ , and resveratrol connected to nanoparticles 1  $\mu\text{M}$ . We evaluated the cleavage rate and blastocysts production, ROs production, oocyte nuclear maturation, and cellular apoptosis rate. To measure the production rate, we used 789 oocytes and the Ros and nuclear maturation analysis were made using probes 2',7'- dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) and 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI), respectively, with 130 and 95 oocytes. The cellular apoptosis rate was done in 117 embryos through propidium iodide. The statistical analysis was made using the Sigma Plot program version 11, and the data were considered significant with  $P < 0.05$  (bilateral). The use of diluted resveratrol at 1 $\mu\text{M}$  decreased the cleavage rate of the blastocysts, and there was no difference between the treatments at ROs production, oocyte maturation and cellular apoptosis. The resveratrol shows better results when associated to silica nanoparticles at the cleavage rate and blastocysts related to its diluted form at 1 $\mu\text{M}$  concentration, which may be associated to a decrease of the toxicity of the antioxidant because of the controlled release when it is associated to these nanomaterials.

**Keywords:** Antioxidants. Embryo. Reactive oxygen species. Oxidative stress. *In vitro* production of embryos.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Análise de correlação entre a taxa de clivagem (%) e a produção de espécies reativas de oxigênio de ovócitos após o processo de maturação com os diferentes tratamentos .....	25
--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporção (média±epm) de clivagem e de produção de blastocistos (Blas.) nos tratamentos de maturação ovocitária utilizando resveratrol (Resv.) e nanopartícula de resveratrol. ....	24
Tabela 2 - Intensidade de fluorescência de produção de ROs de ovócitos após o processo de maturação com os diferentes tratamentos. ....	24
Tabela 3 - Porcentagem (média ± epm) de ovócitos nas fases de vesícula germinativa, metáfase I, metáfase II de acordo com os tratamentos. ....	25
Tabela 4 - Taxa de degeneração celular (média ± epm) medida pela intensidade de fluorescência do iodeto de propídeo emitida pelos embriões produzidos a partir dos ovócitos submetidos aos diferentes tratamentos de maturação. ....	26

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVO .....</b>	<b>12</b>
<b>3 REFERÊNCIAL TÉORICO .....</b>	<b>13</b>
3.1 PROCESSOS DA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES .....	13
3.2 ESTRESSE OXIDATIVO E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO .....	14
3.3 AÇÃO DO RESVERATROL .....	15
3.4 AÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	19
3.5 MODO DE AÇÃO DAS PROBES DCF, DAPI E IODETO DE PROPÍDEO.....	20
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
4.1 REAGENTES .....	20
4.2 LOCAL E ANIMAIS .....	20
4.3 COLETA E SELEÇÃO DE OVÓCITOS .....	20
4.4 MATURAÇÃO IN VITRO .....	21
4.5 FECUNDAÇÃO E CULTIVO IN VITRO (FIV E CIV) .....	21
4.6 NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E MATURAÇÃO OVOCITÁRIA.....	22
4.7 AVALIAÇÃO DA APOPTOSE EMBRIONÁRIA .....	23
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>29</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As biotecnologias têm sido usadas cada vez mais para aumentar a eficiência reprodutiva de animais geneticamente superiores e também modificar em um curto espaço de tempo, o cenário de seleção animal (COUTO et al., 2017). Entre elas destaca-se a produção *in vitro* de embriões (PIVE), utilizada para aumentar o uso de ovócitos, pois é possível coletar os ovócitos imaturos ainda no ovário, maturá-los, fertilizá-los e cultivá-los *in vitro* até o estágio de blastocisto (CHAVES et al., 2010). O Brasil se destaca na PIVE, ocupando um lugar de destaque no ranking mundial (VIANA et al., 2018). Diante disso torna-se cada vez mais importante buscar medidas para aprimorar os resultados da PIVE (VIANA et al., 2018; GONÇALVES e VIANA, 2019).

Entre as vantagens da PIVE comercial estão: diminuição do intervalo de gerações, produção de um grande número de embriões por vaca e observação de eventos biológicos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário inicial (GOTTARDI e MINGOTI, 2009). Para que a PIVE tenha sua eficiência máxima é preciso ter conhecimento dos fatores que interferem nas suas etapas, sendo estas: maturação ovocitária, fecundação na qual são determinantes os procedimentos de capacitação dos espermatozoides e o cultivo *in vitro*, em que as necessidades do embrião devem ser atendidas para seu desenvolvimento até o estágio de blastocisto (THOMPSON, 2000).

Somente 25 a 40% dos ovócitos submetidos à etapa de maturação (MIV) são competentes para o desenvolvimento até o estágio de blastocisto, o que se torna um entrave para a produção *in vitro* de embriões (FARIN et al., 2007). Entre os fatores que influenciam essa etapa cita-se a alta tensão de oxigênio associada à interferência de luz, temperatura e ausência de antioxidantes naturalmente presentes no fluido folicular (WANG et al., 2002). Assim, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROs), e, portanto, o *estresse* oxidativo está relacionado à baixa eficiência da maturação ovocitária e desenvolvimento embrionário (AGARWAL, GUPTA e SHARMA, 2005). Além disso, apesar da técnica da PIVE estar consolidada a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* ainda é inferior aos produzidos *in vivo*, com taxas de produção dos protocolos usuais não ultrapassando 40%. Assim torna-se importante buscar cada vez mais ferramentas para incrementar os resultados, para com isso fazer com que os embriões produzidos *in vitro* tenham o potencial de sobrevivência próximo dos produzidos *in vivo* (VIANA et al., 2012).

A tensão de oxigênio está ligada ao estresse oxidativo, o qual pode ser amenizado com o uso de antioxidantes, definidos como qualquer substância que retarda ou previne a oxidação de determinado substrato. São importantes por converter as espécies reativas de oxigênio em água, prevenindo assim a superprodução das mesmas (LUZ et al., 2011).

Os antioxidantes são classificados como enzimáticos ou naturais (superóxido dismutase, glutatona, glutatona redutase, glutatona peroxidase, catalase), sendo o primeiro sistema a agir nas espécies reativas de oxigênio, ou não enzimáticos (ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, zinco, selênio, carotenoides), que reduzem as lesões induzidas pelas espécies reativas de oxigênio (AGARWAL et al., 2005; RIBEIRO et al., 2005; RUDER et al., 2008).

O resveratrol está ligado a diminuição na produção de ROs, reduzindo assim o acúmulo de produção das mesmas. Esta diminuição ocorre diretamente ou por atuação nas vias de sinalização que produzem estes radicais livres (LOPEZ-VELEZ et al., 2003).

As nanopartículas podem ser usadas em diversas áreas da saúde e em aplicações como biosseparação, adsorção, catálise, liberação controlada de fármacos, marcadores químicos, hormônios, peptídeos, corantes, cosméticos entre outros (SHEN et al., 2014), e especificamente, as de sílica tem se destacado na última década em relação ao seu uso como carreadoras de medicamentos (VAZQUEZ et al., 2017). Entre as características da nanopartícula de sílica estão: alta área específica, volume de poros grande, alta estabilidade mecânica e química e serem biodegradáveis (VALLET-REGI et al., 2007; SLOWING et al., 2007). Seu uso associado ao resveratrol se torna interessante pelo armazenamento do antioxidante e liberação controlada do mesmo (ANDERSON et al., 2004). Assim o uso do resveratrol ligado às nanopartículas de sílica é uma das ferramentas que pode ser utilizada para aprimorar o resultado da PIVE (LONERGAN et al., 2000).

## **2 OBJETIVO**

Objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos das diferentes concentrações de resveratrol na forma diluída (0,5 $\mu$ M; 1 $\mu$ M) e sua associação a nanopartículas de sílica (0,5 $\mu$ M e 1 $\mu$ M) durante a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos, em relação a taxa de clivagem e formação de blastocistos, produção de espécies reativas de oxigênio, maturação nuclear ovocitária e apoptose celular embrionária.

### 3 REFERÊNCIAL TEÓRICO

#### 3.1 PROCESSOS DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

A PIVE compreende três etapas: maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, as quais devem ocorrer de forma sincrônica para que o processo tenha bons resultados (COUTO et al., 2017). Durante a maturação ovocitária nuclear e citoplasmática ocorrem os eventos para que o ovócito expresse seu máximo desenvolvimento após a fecundação (CROCOMO et al., 2012). Entre estes eventos estão cascatas de ativação e inibição de enzimas, hormônios e fatores de crescimento (CASTRO; PAULO e HANSEN, 2007).

Para que a maturação *in vitro* seja iniciada, o fluido folicular é aspirado dos ovários vindo de abatedouros ou *in vivo* por punção ovariana, sendo que após a retirada do folículo, os ovócitos retomam espontaneamente a meiose pela perda de comunicação celular entre as células do complexo cumulus-ócito (COCs) e também pelo bloqueio da ação dos fatores inibidores presentes nas células foliculares (GOTTARDI e MINGOTI, 2009).

A etapa de maturação nuclear envolve a progressão da meiose a partir do diplóteno da prófase 1, designado morfológicamente como vesícula germinativa, até a metáfase II, sendo que os ovócitos completam a sua maturação nuclear e citoplasmática em 18 a 24 horas (GOTTARDI et al., 2012). Entre as mudanças que ocorrem durante a maturação nuclear estão: condensação dos cromossomos, quebra da vesícula germinativa e extrusão do 1º corpúsculo polar (GOTTARDI e MINGOTI, 2009). Além da maturação nuclear também ocorrem alterações relacionadas a maturação citoplasmática, as quais envolvem rearranjo de organelas, síntese de proteínas e mRNA, as quais são determinantes para a fertilização e posterior desenvolvimento embrionário (WU et al., 1996).

Também se pode considerar que a presença das COCs é importante na maturação *in vitro* para que o ovócito atinja competência para ser fecundado e se desenvolver, pois o grau de expansão da COCs está relacionado com uma maior taxa de clivagem em relação aos ovócitos sem as células do cumulus ou com o cumulus compacto (GUTNISKY et al., 2007).

A expansão das COCs na maturação ovocitária se torna importante pela secreção de fatores que promovem o crescimento, desenvolvimento e a competência de desenvolvimento do ovócito, como pela remoção dos componentes supressores do desenvolvimento embrionário (HASHIMOTO et al., 1998).

O efeito benéfico das células do *cumulus* durante a maturação *in vitro* foi mostrada quando se comparou complexos cumulus-ócito, ovócitos desnudos e ovócitos desnudos cocultivados com células do cumulus em suspensão, pois quando há o acoplamento entre os ovócitos e as células do cumulus há uma maior porcentagem de blastocistos e eclosão em relação à ovócitos desnudos e aos cocultivados com células do cumulus em suspensão, demonstrando assim que o COC é essencial para aquisição da competência do ovócito e o desenvolvimento embrionário inicial (GOTTARDI et al., 2012).

Após a finalização do processo de maturação nuclear e citoplasmática o ovócito se torna apto a ser fecundado, sendo que durante a FIV é importante avaliar aspectos como o preparo do sêmen e indução da capacitação espermática (COELHO et al., 2000). Posteriormente, durante o cultivo *in vitro* se dá o desenvolvimento do ovócito fertilizado até o estágio de blastocisto e durante esta etapa fatores intrínsecos e extrínsecos como meios de cultivo, condições de temperatura e atmosfera gasosa interferem no processo (NAGAI, 2001).

### 3.2 ESTRESSE OXIDATIVO E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Um dos fatores que influencia o processo de maturação ovocitária e conseqüentemente produção e qualidade embrionária nas etapas seguintes é o estresse oxidativo. Em condições fisiológicas existe a produção de ROs, as quais estão equilibradas com a quantidade de antioxidantes. Quando há uma liberação excessiva de ROs ocorre o *estresse* oxidativo e conseqüentemente injúrias celulares (ANDRADE et al., 2010).

Pode-se definir ROs como todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio que possuem a capacidade de reagir com os compostos que estejam próximos. Compostos são consideradas agentes oxidantes ou agentes redutores, quando são considerados receptores e doadores de elétrons e possuem como principal local de produção a mitocôndria (AGARWAL et al., 2005).

Durante o processo de fosforilação oxidativa ocorre o transporte de elétrons através das reações de reduções oxidativas (REDOX), que vão se ligar a uma molécula de oxigênio. Em situações normais, o oxigênio é convertido em água e a energia armazenada é usada para produção de ATP. Porém, fisiologicamente durante este processo uma pequena quantidade de oxigênio consumido pela mitocôndria é convertida em ROs no lugar da água (DOWNLING e SIMMONS, 2009). Assim, é normal a produção de uma quantidade mínima de ROs, exercendo um papel importante no funcionamento do organismo, por serem responsáveis pelo transporte de elétrons na cadeia respiratória e atuar como moléculas sinalizadoras. Este efeito

benéfico se torna prejudicial quando ocorre uma produção anormal de ROs e diminui a liberação de agentes antioxidantes. Entre os ROs estão: radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) (DOWNLING e SIMMONS, 2009).

O sistema de defesa antioxidante possui duas classificações: a que atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão e a que tem a função de reparar a lesão ocorrida. A catalase é um dos sistemas de defesa antioxidante, sendo classificada como uma hemoproteína citoplasmática produzida pelo corpo que catalisa a redução de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$ . Assim, é um dos métodos utilizados para aferição indireta das ROs e conseqüentemente das lesões oxidativas (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Na situação de estresse oxidativo, tanto o sistema reprodutor feminino como o masculino vão ser prejudicados, por distúrbios na maturação do ovócito até na gestação e na espermatogênese, respectivamente. Além disso, diversos processos fisiológicos podem ser prejudicados nesta condição, gerando conseqüências como peroxidação dos lipídios das membranas celulares, danos ao DNA das células da linha germinativa e morte celular por apoptose das células da granulosa ou degeneração de gametas e embriões (ANDRADE et al., 2010; SILVA et al., 2010).

Dentre estes efeitos a peroxidação lipídica é considerada a que tem efeito mais prejudicial, por resultar em alterações celulares irreversíveis, sendo assim uma das principais causas da baixa eficiência da maturação ovocitária e cultivo embrionário *in vitro*, comprometendo a qualidade ovocitária e embrionária (LIMA e ABDALLA, 2001). Nesta condição, há uma redução de passagem de nutrientes e fatores de sobrevivência para os ovócitos, o que impede o seu desenvolvimento (KHAZAEI e AGHAZ, 2017). Durante o estresse oxidativo também podem ocorrer alterações estruturais em moléculas como proteínas e lipídios, que levam a alterações mitocondriais, bloqueio do desenvolvimento celular no embrião, excesso de consumo de ATP e conseqüentemente apoptose (KARAŞAHİN e ARIKAN, 2015).

Em relação ao processo de maturação ovocitária, alguns autores citam que uma mínima tensão de oxigênio, como 5% é benéfica para o processo, enquanto outros trabalhos mostram que uma quantidade maior como 20% melhora o desenvolvimento dos ovócitos. Hashimoto et al. (2000) relataram que a tensão de oxigênio de 5% é benéfica para o desenvolvimento dos ovócitos em relação a de 20%, assim como Karja et al. (2004). Após o processo de fertilização, a atmosfera de 5% de  $O_2$  é melhor para o desenvolvimento de embriões em relação a de 20% (PABON et al., 1989). Thompson et al. (1990) também viram



que durante o cultivo *in vitro* concentrações reduzidas de tensão de oxigênio em relação a de 20% aumentam o número de células dos embriões. Assim, acredita-se que a baixa tensão de oxigênio está ligada a redução do *estresse* oxidativo e conseqüente melhor qualidade e desenvolvimento embrionário (FUJITANI et al., 1997). Baseado nas controvérsias presentes na literatura ainda são necessários mais estudos para definir os valores de tensão de oxigênio que devem ser usadas em cada etapa da PIVE e suas conseqüências durante o processo.

### 3.3 AÇÃO DO RESVERATROL

Os antioxidantes presentes no fluido folicular e oviduto protegem os ovócitos e embriões do *estresse* oxidativo *in vivo*. Assim, durante o processo da produção *in vitro* em embriões, está defesa natural é perdida. Com esta limitação torna-se necessário o uso de algumas medidas para que a eficiência desta biotecnologia não seja comprometida.

O resveratrol é um dos antioxidantes que pode ser utilizado durante a maturação ovocitária para diminuir a produção de ROs, porém o mesmo apresenta um efeito dose dependente e em concentrações maiores pode se tornar prejudicial para o processo. Uma das alternativas para aprimorar o uso do resveratrol é a sua associação com nanopartículas (GARCÍA PÉREZ et al., 2012).

Inicialmente, foi visto que o resveratrol estava relacionado a proteção das plantas contra fungos e bactérias e com os estudos posteriores pode-se concluir que a substância também possui atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais (LANGCAKE; CORNFORD e PRYCE, 1979; ITAMI et al., 2015).

Em relação ao sistema reprodutivo das fêmeas pode ser visto que o resveratrol possui ação tanto *in vitro* como *in vivo* em diferentes espécies, atuando desde a maturação ovocitária até o desenvolvimento final do blastocisto e também na regulação de genes, aumentando por exemplo, a expressão do gene ligado a família das sirtuínas, conhecido como SIRT-1, presente nas células da granulosa, nos ovócitos e nos blastocistos (ITAMI et al., 2015; WANG et al., 2014).

Lee et al. (2010) e Kwaka et al. (2012) ao avaliarem o uso de resveratrol em concentração como a de 2,0  $\mu$ M durante o processo de maturação ovocitária observaram uma diminuição na produção de ROs e posteriormente aumento na taxa de formação de blastocisto e melhora na qualidade embrionária.

A SIRT- 1, ligada ao coativador transcricional de receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama 1-alfa (PGC-1alfa), está envolvida na regulação positiva de enzimas antioxidantes, como a catalase, assim desempenha um papel importante na detecção e modulação da condição REDOX, protegendo as células e tecidos que são expostas ao *estresse* oxidativo (HASEGAWA et al., 2008). Também foi relatado que o resveratrol está ligado ao aumento da concentração de ATP nos ovócitos, o que leva a ativação da SIRT-1 e ao aumento da habilidade de crescimento e desenvolvimento dos mesmos (ITAMI et al., 2015).

Além de conferir resistência em relação a disfunção mitocondrial, o resveratrol também impede a apoptose e aumenta a concentração intracelular de glutathiona (ROBB et al., 2008). Se comparado a outros antioxidantes como a cisteamina e quercetina, o resveratrol se torna mais eficiente na redução da produção de ROs e aumento do número de células dos embriões, respectivamente (SOVERNIGO et al., 2017).

A SIRT-1 atua a nível mitocondrial, sendo juntamente com a produção de ATP, essenciais para a qualidade e desenvolvimento ovocitário (WAI et al., 2010). Ao comparar o tratamento controle com o grupo em que o meio de maturação foi suplementado com 20  $\mu$ M do resveratrol, pode ser visto que o tratamento com o antioxidante aumentou a expressão da SIRT-1 e também o número total de células dos blastocistos (TAKEO et al., 2014). Sugiwama et al. (2015) também observaram que o resveratrol está ligado ao aumento da concentração de ATP nos ovócitos e da expressão da SIRT- 1, aumentando assim o desenvolvimento dos mesmos até o estágio de blastocisto.

Em processos como o de vitrificação dos ovócitos há uma alteração na expressão de genes e na epigenética, como a diminuição da expressão da SIRT-1, efeito que pode ser revertido quando é adicionado o resveratrol. Também há uma melhora na taxa de formação e qualidade de blastocistos com o uso do antioxidante em ovócitos vitrificados, além da restauração de genes que tinham sido afetados pelo processo e da metilação do DNA (CHEN et al., 2019).

O resveratrol quando adicionado ao meio de maturação também é responsável pelo aumento da secreção de progesterona e diminuição de estradiol pelas COCs, promovendo assim a expansão destas células e conseqüentemente formação de corpúsculo polar (WANG et al., 2014). O mesmo, quando utilizado na concentração de 5  $\mu$ M durante a maturação *in vitro* de ovócitos suínos culminou em uma maior taxa de extrusão do primeiro corpúsculo polar, além da menor produção de ROs. Além disso, houve uma maior expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes como a catalase e superóxido dismutase 1, menor

expressão de genes relacionados a apoptose e aumento na taxa blastocisto com adição do resveratrol indicando assim uma melhora tanto na qualidade dos ovócitos como no desenvolvimento e competência dos blastocistos (WANG et al., 2019).

Existe também uma forma glicosídica do resveratrol conhecida como “polidatina” que pode ser adicionada durante a maturação *in vitro* para melhorar o resultado da mesma. Foi relatado que a concentração de 1,0  $\mu\text{M}$  melhorou o desenvolvimento dos blastocistos, assim como o tratamento com o antioxidante aumentou a expressão da SIRT- 1 e diminuiu a produção das ROs (KHAN et al., 2017).

A adição de resveratrol no meio de maturação promoveu maior expansão das células do cumulus, o que é necessário para o processo de maturação (WANG et al., 2014). O mesmo pode ser visto nos estudos de Lee et al. (2017). Os autores citaram que o tratamento com resveratrol levou a uma completa expansão das COCs (grau 4), o que está ligado com uma melhor maturação nuclear do ovócito e consequente elevação nas taxas de clivagem, formação de blastocistos e de células totais no embrião. Também pode-se observar que o tratamento com resveratrol e resveratrol associado com melatonina promoveu uma maior expansão das COCs em relação ao grupo controle (LEE et al., 2018).

A apoptose, considerada a morte programada das células, é marcada por condensação da cromatina e fragmentação do DNA. A mesma é importante para eliminar células que não são necessárias ou são indesejáveis durante o desenvolvimento embrionário normal, mas não é comum de ocorrer no blastocisto (HARDY, 1997; HARDY et al., 2003). Quando há uma redução de 30% no número de células da massa celular interna (MCI) dos blastocistos, há risco de não desenvolvimento dos mesmos, pois seu crescimento e o potencial de embriogênese é comprometido (TAM, 1988). O *estresse oxidativo*, é um dos responsáveis por este processo. Ao se utilizar antioxidantes durante o processo de maturação há uma diminuição dos genes relacionados a apoptose, o que aumenta a eficiência da produção *in vitro* de embriões (KWAKA et al., 2012). Também foi observado por Chan (2011) a relação entre o resveratrol e a diminuição da produção de ROs e consequentemente redução do índice de apoptose da MCI dos blastocistos.

O resveratrol, quando utilizado durante a maturação *in vitro* em pequenas concentrações como a de 0,25  $\mu\text{M}$ ; 0,5  $\mu\text{M}$  e 2,0  $\mu\text{M}$  aumenta a taxa de formação de blastocistos se comparado a concentrações maiores como a de 5  $\mu\text{M}$  e ao grupo controle (KWAKA et al., 2012; MUKHERJEE et al., 2014; ZABIHI et al., 2019).

Ao se estudar o efeito do resveratrol no meio de maturação ovocitária de cabras pré-púberes foi visto que a adição do antioxidante melhorou a taxa de desenvolvimento de blastocistos, efeito que foi mais evidente nos ovócitos mais desenvolvidos e com melhor qualidade (PIRAS et al., 2018).

Em relação ao número total de células dos blastocistos pode-se observar que o mesmo apresentou um aumento mais acentuado quando utilizado o resveratrol em concentrações de 2,0  $\mu$ M e 0,5  $\mu$ M durante a MIV (KWAK et al., 2012; ZABIHI et al., 2019).

### 3.4 AÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas podem ser consideradas partículas ou material de tamanho inferior a 100nm, que possuem a capacidade de se ligar a outras substâncias, sendo assim carreadores, ou que sejam por si só biologicamente ativa. Assim podem ser utilizadas em diversas áreas como a de saúde e pesquisa por controlar a liberação de determinadas substâncias, o que reduz a citotoxicidade e também são responsáveis pelo aumento da solubilidade e biodisponibilidade (KREUTER, 2007; SHI; GUSTAFSON e MAC KAY, 2014). Diversas características como composição, tamanho, forma, revestimento da superfície vão interferir na sua ação (WANG et al., 2013; SARIKAYA et al., 2003; HOU, ZHU, 2017).

As nanopartículas mesoporosas de sílica (poros de tamanho entre 2 e 50 nm) são usadas com a finalidade de transporte de medicamentos ou encapsulamento de moléculas (HAO; LI e TANG; 2016). Possuem como característica serem biocompatíveis, possuem grande área de superfície e volumes de poros, aumentarem a solubilidade de drogas, a cinética de liberação dos fármacos e possuem alta capacidade de se ligar a outras substâncias (SANTOS et al., 2013). São feitas a partir de um precursor (tetraetilortossilicato ou sódio silicato) em meio alcoólico sob condições básicas e com um surfactante (HODALI; MARZOUQA e TEKFA, 2016).

Em relação ao resveratrol o mesmo possui como características ter baixa biodisponibilidade e solubilidade, ser instável por sofrer interferência do ar e da luz, além de ser facilmente oxidável, o que reduz a sua viabilidade (WANG et al., 2002; KIM et al., 2009).

Assim, torna-se importante a busca por mecanismos para aperfeiçoar o uso do resveratrol, preservando suas atividades biológicas e aumentando sua biodisponibilidade, levando-se em conta que o estresse oxidativo decorrente da PIVE não pode ser evitado e que

o excesso de produção de espécies reativas de oxigênio pode ser controlado pelo uso da suplementação dos meios de cultivo com antioxidantes (TRINDADE et al., 2016).

O sistema de liberação modificada de antioxidantes como a ligação com nanopartículas de sílica pode ser uma opção viável e promissora para aumentar a eficácia do uso do resveratrol. As nanopartículas também são responsáveis pela liberação gradativa e lenta das substâncias a que estão ligadas, o que se torna interessante para o uso na PIVE, pois o uso de antioxidantes em alta concentração pode ser prejudicial ao processo (WANG et al., 2002).

### 3.5 MODO DE AÇÃO DAS PROBES DCF, DAPI E IODETO DE PROPÍDEO

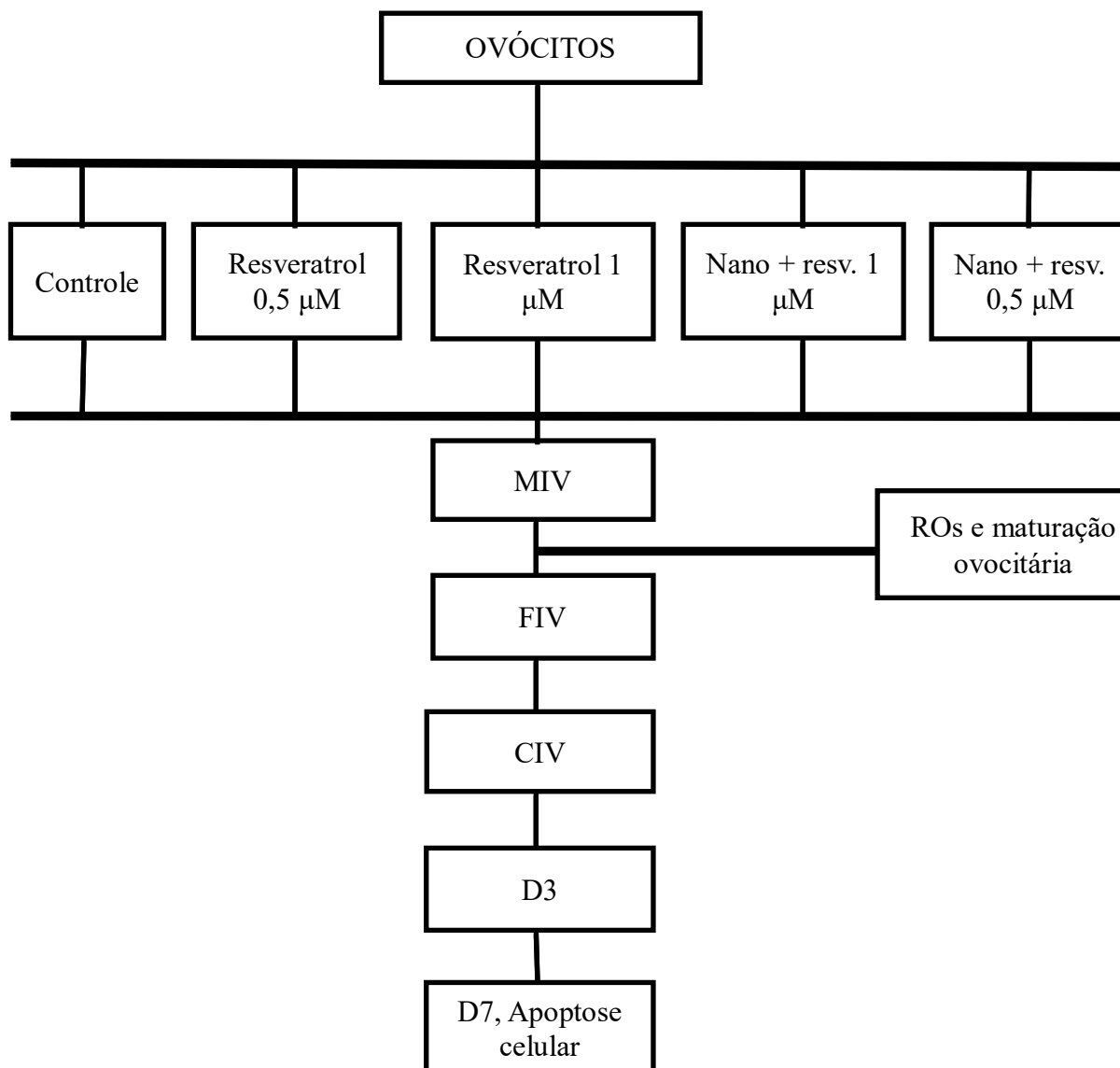
Um método quantitativo que pode ser utilizada para avaliação do estresse oxidativo é a probe DCF, o qual se origina do 2',7'- dichlorodihydrofluorescein diacetato (DCFH-DA). O DCFH-DA possui como característica ser não fluorescente e atravessar facilmente a membrana celular. Ao sofrer o processo de desacetilação por ação de enzimas esterases intracelular se transforma em DCFH, que em contato com as ROs forma o DCF, o qual é altamente fluorescente e produz uma marcação em verde, sendo que quanto maior o estresse oxidativo da célula maior será a emissão da coloração fluorescente. Para ser feita a marcação ovocitária com o DCF, os ovócitos são incubados na ausência de luz, em meio contendo 10  $\mu$ M da probe por 30 minutos, em 38,5°C e sob 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, a leitura das lâminas é feita pela microscopia confocal LSM 510 meta, a qual ira quantificar a emissão de ROs. (ARANDA et al., 2013; AFRI et a., 2004).

Em relação a classificação do estágio da maturação ovocitária, a probe que pode ser utilizada é o 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI), marcador específico para o DNA ligado a região adenina-timina. O DAPI também pode ser relacionado com a citometria de fluxo, coloração cromossômica, visualização e quantificação do DNA em histoquímica e bioquímica. Para avaliação da maturação ovocitária, o mesmo é responsável pela marcação em azul fluorescente da vesícula germinativa, placa metafisária e corpúsculo polar. Para ser feita esta avaliação, os ovócitos são colocados em lâmina de microscópio adicionando uma gota do meio de montagem Fluoroshield™ com DAPI em seguida é feita a avaliação da marcação das estruturas citadas através do microscópio de epifluorescência EVOs®FL (KAPUSCINSKI, 2009).

Um dos métodos utilizados para a avaliação embrionária é a marcação com iodeto de propídeo. O mesmo é responsável pela marcação de células que estão mortas ou que tem sua membrana plasmática danificada, pois o mesmo não é permeável na membrana íntegra. Assim, é possível diferenciar as células viáveis das que estão em processo de degeneração. Para ser feita a marcação com o iodeto de propídeo os embriões devem permanecer em contato com a probe por 15 minutos e posteriormente fixados em paraformol por 15 minutos. A leitura da lâmina é feita através da microscopia confocal LSM 510 meta, a qual irá quantificar a emissão de fluorescência vermelho pela probe (ASSUMPCÃO et al., 2002).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 DESENHO EXPERIMENTAL



#### 4.1 REAGENTES

Os reagentes utilizados neste estudo foram provenientes da Sigma (Sto Louis MO, USA).

#### 4.2 LOCAL E ANIMAIS

Os ovários foram coletados de vacas após o abate no frigorífico Luciana, localizado no município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. O transporte ocorreu em garrafa térmica com temperatura entre 34°C a 38°C, em um período máximo de duas horas. Após a coleta, os ovários foram aquecidos com solução fisiológica a 0.9% para manter a temperatura adequada e, posteriormente, conduzido ao Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia.

#### 4.3 COLETA E SELEÇÃO DE OVÓCITOS

A temperatura dos ovários, ao chegar ao laboratório estava entre 36 e 37°C. Os ovários foram lavados por três vezes em NaCl 0,9% estéril e os folículos ovarianos aspirados com uso de seringa descartável de 10,0 ou 20,0 mL e agulha 40 x 1,2 (21G). O líquido folicular aspirado foi armazenado em tubos tipo corning de 15,0 mL em banho maria a 37°C. Após 15 minutos decorrente da aspiração, tempo necessário para que ocorresse a sedimentação, iniciou-se o rastreamento dos ovócitos. O pellet foi transferido para placa de Petri (100 x 20 mm) e sob estereomicroscópios (15x) foi feita a seleção dos ovócitos de acordo com Leibfried e First (1979). Somente os ovócitos classificados como graus I e II foram utilizados no experimento (LEIBFRIED E FIRST, 1979).

#### 4.4 MATURAÇÃO *IN VITRO*

Os ovócitos de graus I e II foram separados aleatoriamente em 1 dos 4 tratamentos: controle (sem antioxidantes), resveratrol diluído (0,5 µM), resveratrol diluído (1µM), resveratrol ligado a nanopartícula (0,5 µM) e resveratrol ligado a nanopartícula (1µM). Foram feitas 17 réplicas durante o experimento, com um total de 789 ovócitos.

Os ovócitos grau I e grau II foram transferidos para outra placa de Petri de 35 mm, onde foram lavados uma vez em meio de lavagem base TCM-199 HEPES e em seguida lavados duas vezes em meio base de maturação, de acordo com Appoloni et al. (2016) com adaptações, constituído de base TCM-199 suplementado com 1 mg/mL de BSA, 1 mM de

piruvato, 0,5 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH, Folltropin-V, Bioniche, Ontario, Canadá), 5 µg/mL de hormônio luteinizante (LH), 1 µg/mL 17β-estradiol e 100 µM de cisteamina. Após a lavagem, os ovócitos foram transferidos para gotas de 100 µL de meio de maturação sob óleo mineral e incubados em estufa a 38,5°C em atmosfera úmida contendo 5% de gás carbônico durante 22 a 24 horas.

#### 4.5 FECUNDAÇÃO E CULTIVO *IN VITRO* (FIV E CIV)

Para ser realizada a fecundação *in vitro* foram preparados os meios TALP- SPERM, TALP- FERT e o gradiente percoll. Após a maturação, os ovócitos foram lavados em duas gotas do meio TALP-FERT ou meio FIV acrescido de amicacina (83 mg/mL), solução de piruvato (0,11 mg/mL), PHE (2 µM penicilamina, 1 µM hipotaurina, 1 µM epinefrina), heparina (10 µg/mL) e albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos essenciais (6 mg/mL), passados para a placa de FIV em gotas de 100 µL do mesmo meio TALP-FERT seguindo a mesma distribuição da MIV. A placa de fecundação foi colocada na estufa até a finalização da capacitação espermática.

A fecundação foi realizada com sêmen selecionado do mesmo touro para todas as réplicas. As palhetas de sêmen foram descongeladas e os espermatozoides submetidos ao processo de seleção e capacitação pelo método de centrifugação com gradientes descontínuos de Percoll® adaptado de Parrish et al. (1995). Foi depositado em um tubo de 15 mL, 500 µL de TALP-SPERM e 500 µL da solução de Percoll 90%, formando assim, a camada de Percoll 45%. Abaixo da camada de Percoll 45% foi colocado 1 mL da solução de Percoll 90%, totalizado assim 2 mL dos gradientes. Após a formação do gradiente Percoll, o sêmen foi depositado sobre ele e centrifugado a 2400 rpm por 30 minutos.

Após a capacitação foram avaliados motilidade, vigor e concentração por contagem em câmara de Neubauer, com o auxílio de um microscópio de luz. Foi feita a contagem de espermatozoides para determinar o volume de meio TALP-SPERM adicionado ao tubo FIV para ajustar a concentração espermática em 100.000 espermatozóides por gota de 100 µL, e posteriormente, calculada a quantidade de meio TALP-FERT acrescido no sêmen para que este se encontrasse na concentração de  $25 \times 10^{-6}$  de espermatozoides/mL, sendo a dose inseminante utilizada de 4 µL por gota, considerando assim o dia da FIV como o dia 0 (D0) do desenvolvimento embrionário. A fecundação foi realizada na placa de FIV em gotas contendo meio TALP-FERT. Os COCs juntamente com os espermatozoides foram levados para a estufa por 12 a 18 horas nas mesmas condições da maturação.



Para a etapa de CIV, os possíveis zigotos foram desnudos e lavados 3 vezes em meio com base SOF (Synthetic Oviduct Fluid) suplementado com solução de piruvato (0,11mg/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, contendo de 10 a 15 zigotos 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 de avaliado o número de blastocistos (taxa de blastocisto).

#### 4.6 AVALIAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DA MATURAÇÃO OVOCITÁRIA

Após a maturação, os ovócitos foram desnudados mecanicamente (remoção das células do cumulus) e foram feitas três lavagens em solução PBS acrescido de BSA (0,4%). Após a lavagem, parte dos ovócitos foram incubados na ausência de luz, em meio contendo 10 µM de 2',7'- dichlorodihydrofluorescein diacetato (DCFDA) por 30 minutos, em 38,5°C e sob 5% de CO<sub>2</sub> para marcar a produção de ROs.

Após a marcação com DCF, os ovócitos foram lavados três vezes em PBS e fixados em paraformaldeído 4% por 15 minutos em temperatura de 36°C. Após a fixação, foram lavados novamente em gotas contendo solução de PBS e colocados em lâmina de microscópio adicionando uma gota do meio de montagem Fluoroshield<sup>TM</sup> com DAPI (Sigma Aldrich, F6057).

A mensuração das espécies reativas de oxigênio foi realizada em 130 ovócitos, por meio da microscopia confocal LSM 510 meta e do DCF. O DCF é caracterizado por ser um composto altamente fluorescente, e quando está em contato com as ROs gera uma marcação verde nos ovócitos, a qual é quantificada através da leitura da lâmina com os ovócitos corados com DCF pela microscopia confocal.

A avaliação da maturação ovocitária foi realizada em 95 ovócitos por meio da coloração DAPI, vista através do microscópio de epifluorescência EVOs®FL. O DAPI é um marcador fluorescente que se liga fortemente ao DNA (região adenina-timina), sendo responsável pela marcação da vesícula germinativa (presença de um núcleo esférico rodeado por uma membrana nuclear e cromossomos descondensados), placa metafásica e corpúsculo polar.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA

Para avaliar a integridade da membrana plasmática os embriões no D7 foram lavados 3 vezes em solução PBS- soro feral bovino, corados com iodeto de propídio por 15 minutos e posteriormente fixados em paraformol por 15 minutos. Foram avaliados 117 embriões através da microscopia confocal LSM 510 meta e coloração iodeto de propídio, o qual gera uma marcação vermelho fluorescente. O iodeto de propídio é responsável por corar o DNA de células que estão mortas ou tem sua membrana danificada.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio do programa Sigma Plot versão 11 (Systat Software Inc., EUA). Os efeitos do tratamento nas variáveis vesícula germinativa, metáfase I e metáfase II foram analisados pelo teste qui-quadrado ou exato de Fisher. A comparação de médias (clivagem, blastocisto, produção de ROs e iodeto de propídeo) foi realizada pelo teste de Fisher (LSD). Os dados foram apresentados na forma de porcentagem e média ( $\pm$  erro padrão da média) e considerados significativos quando  $P < 0,05$  (bilateral).

### 5 RESULTADOS

Um total de 789 ovócitos foi submetido ao processo de PIVE. O tratamento com resveratrol 1  $\mu\text{M}$  apresentou uma taxa reduzida ( $P < 0,05$ ) de clivagem em relação aos demais grupos. Além disso, os grupos controle, resveratrol 0,5  $\mu\text{M}$ , nanopartícula + resveratrol 1  $\mu\text{M}$  e nanopartícula + resveratrol 0,5  $\mu\text{M}$ , apresentaram taxas de clivagem semelhantes ( $P > 0,05$ ). As taxas de blastocistos (% blastocistos / ovócitos) dos grupos controle, resveratrol 0,5  $\mu\text{M}$ , nanopartícula + resveratrol 1  $\mu\text{M}$  e nanopartícula + resveratrol 0,5  $\mu\text{M}$  foram similares ( $P > 0,05$ ). Entretanto, foi observada uma redução ( $P < 0,05$ ) na proporção de blastocistos no tratamento resveratrol 1 $\mu\text{M}$ . Adicionalmente, pode-se observar que a porcentagem de produção de blastocistos considerando o número de embriões clivados foi semelhante entre os tratamentos (Tabela 1).

**Tabela 1** - Proporção (média ± epm) de clivagem e de produção de blastocistos (Blas.) nos tratamentos de maturação ovocitária utilizando resveratrol (Resv.) e nanopartícula de resveratrol.

<b>Grupos</b>	<b>%Clivagem</b>	<b>%Blas./Ovócito</b>	<b>%Blas./Clivados</b>
Controle (n=159)	83,1 ± 3,8 <sup>B</sup>	39,6 ± 4,1 <sup>B</sup>	47,7 ± 4,3 <sup>A</sup>
Resv. 1 µM (n= 155)	47,9 ± 2,8 <sup>A</sup>	20,5 ± 2,8 <sup>A</sup>	42,7 ± 5,1 <sup>A</sup>
Resv. 0,5 µM (n=158)	81,1± 2,3 <sup>B</sup>	31,2 ± 4,8 <sup>AB</sup>	39,2 ± 6,2 <sup>A</sup>
Nano + Resv. 1 µM (n=158)	84,5±3,2 <sup>B</sup>	40,2 ± 4,6 <sup>B</sup>	47,4 ± 5,1 <sup>A</sup>
Nano + Resv. 0,5 µM (n=159)	79,1±4,6 <sup>B</sup>	34,5 ± 3,9 <sup>B</sup>	5,3 ± 4,9 <sup>A</sup>

<sup>A, B</sup> valores diferem na coluna (P<0,05).

Controle = sem tratamento

Resv. 1 µM = resveratrol diluído 1 µM,

Resv. 0,5 µM = resveratrol diluído 0,5 µM,

Nano + Resv. 1 µM = nanopartículas de sílica + resveratrol 1 µM,

Nano + Resv. 0,5 µM = nanopartículas de sílica + resveratrol 0,5 µM.

Blas = blastocisto

A produção de ROs medida pela intensidade de fluorescência emitida pelo DCF foi semelhante entre os tratamentos (P>0,05; Tabela 2).

**Tabela 2** - Intensidade de fluorescência emitida pela probe DCF em ovócitos após o processo de maturação com os diferentes tratamentos.

<b>Grupos</b>	<b>Intensidade de fluorescência emitida pela probe DCF</b>
Controle	10,4±3,0 <sup>A</sup>
Resveratrol 1 µM	11,3±2,7 <sup>A</sup>
Resveratrol 0,5 µM	7,8±1,9 <sup>A</sup>
Nano + Resveratrol 1 µM	8,5±1,9 <sup>A</sup>
Nano + Resveratrol 0,5 µM	6,6±1,6 <sup>A</sup>

<sup>A, B</sup> valores diferem na coluna (P > 0,05).

Controle = sem tratamento

Resv. 1 µM = resveratrol diluído 1 µM,

Resv. 0,5 µM = resveratrol diluído 0,5 µM,

Nano + Resv. 1 µM = nanopartículas de sílica + resveratrol 1 µM,

Nano + Resv. 0,5 µM = nanopartículas de sílica + resveratrol 0,5 µM.

A porcentagem média de ovócitos nas diferentes fases do processo de maturação foi semelhante entre os tratamentos (P > 0,05, Tabela 3). Os ovócitos considerados imaturos no

presente estudo foram aqueles em que foi possível visualizar a fase de vesícula germinativa e metáfase I (cromossomos altamente condensados e formação de placa metafásica). Já os maduros foram aqueles que estavam na metáfase II (placa metafásica e liberação do primeiro corpúsculo polar).

**Tabela 3** - Porcentagem (média  $\pm$  epm) de ovócitos nas fases de vesícula germinativa (VG), metáfase I (MI), metáfase II (MII) de acordo com os tratamentos após o processo de maturação.

<b>Grupos</b>	<b>VG</b>	<b>MI</b>	<b>MII (taxa de maturação)</b>
Controle	19,04 (4/21) <sup>A</sup>	23,81 (5/21) <sup>A</sup>	57,14 (12/21) <sup>A</sup>
Resv. 1 $\mu$ M	14,28 (2/14) <sup>A</sup>	14,28 (2/14) <sup>A</sup>	71,42 (10/14) <sup>A</sup>
Resv. 0,5 $\mu$ M	27,27 (6/22) <sup>A</sup>	9,09 (2/22) <sup>A</sup>	63,63 (14/22) <sup>A</sup>
Nano + Resv. 1 $\mu$ M	13,33 (2/15) <sup>A</sup>	6,66 (1/15) <sup>A</sup>	80,00 (12/15) <sup>A</sup>
Nano + Resv. 0,5 $\mu$ M	21,73 (5/23) <sup>A</sup>	17,39 (4/23) <sup>A</sup>	60,86 (14/23) <sup>A</sup>

<sup>A,B</sup> valores diferem na coluna ( $P > 0,05$ ).

Controle = sem tratamento

Resv. 1  $\mu$ M = resveratrol diluído 1  $\mu$ M,

Resv. 0,5  $\mu$ M = resveratrol diluído 0,5  $\mu$ M,

Nano + Resv. 1  $\mu$ M = nanopartículas de sílica + resveratrol 1  $\mu$ M,

Nano + Resv. 0,5  $\mu$ M = nanopartículas de sílica + resveratrol 0,5  $\mu$ M.

VG (vesícula germinativa), MI (metáfase I), MII (metáfase II).

A intensidade de fluorescência emitida pelo iodeto de propídeo foi semelhante ( $P > 0,05$ ) entre os grupos avaliados (Tabela 4).

**Tabela 4** - Taxa de degeneração celular (média  $\pm$  epm) medida pela emissão de fluorescência do iodeto de propídeo emitida pelos embriões produzidos a partir dos ovócitos submetidos aos diferentes tratamentos de maturação.

<b>Grupos</b>	<b>IP</b>
Controle	34,1 $\pm$ 3,6 <sup>A</sup>
Resveratrol 1 $\mu$ M	30,8 $\pm$ 5,0 <sup>A</sup>
Resveratrol 0,5 $\mu$ M	45,2 $\pm$ 5,7 <sup>A</sup>
Nano + Resveratrol 1 $\mu$ M	36,1 $\pm$ 3,8 <sup>A</sup>
Nano + Resveratrol 0,5 $\mu$ M	41,6 $\pm$ 4,6 <sup>A</sup>

<sup>A,B</sup> valores diferem na coluna ( $P < 0,05$ ).

Controle = sem tratamento

Resv. 1  $\mu\text{M}$  = resveratrol diluído 1  $\mu\text{M}$ ,  
Resv. 0,5  $\mu\text{M}$  = resveratrol diluído 0,5  $\mu\text{M}$ ,  
Nano + Resv. 1  $\mu\text{M}$  = nanopartículas de sílica + resveratrol 1  $\mu\text{M}$ ,  
Nano + Resv. 0,5  $\mu\text{M}$  = nanopartículas de sílica + resveratrol 0,5  $\mu\text{M}$ .

IP (iodeto de propídeo)

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo o resveratrol utilizado de forma diluída no meio de maturação na concentração de 1  $\mu\text{M}$  foi prejudicial para a taxa de clivagem e de blastocistos/ovócitos e não houve diferença entre a porcentagem de blastocistos em relação ao clivados. Assim, pode-se supor que o efeito prejudicial do resveratrol na concentração de 1  $\mu\text{M}$  ocorre na fase de maturação folicular, e uma vez os ovócitos conseguem atingir a maturação e clivar, o desenvolvimento embrionário subsequente não é alterada pelo antioxidante.

Diversos resultados são encontrados na literatura, na qual o uso do resveratrol durante a maturação ovocitária está ligado a uma maior taxa de clivagem e de formação de blastocistos ou resultados em que a taxa de produção com o uso do antioxidante é semelhante ao grupo controle (LEE et al., 2018).

Algumas das limitações do uso do resveratrol são suas características como baixa estabilidade, solubilidade e também a sensibilidade a luz, além de possuir efeito dose dependente (KIM et al., 2009). Uma das possíveis explicações para o uso do resveratrol associado às nanopartículas na concentração de 1  $\mu\text{M}$  não ter resultado em efeito prejudicial no processo de maturação ovocitária seria a sua liberação gradativa no meio de maturação, o que reduziu sua possível toxicidade.

Estudos prévios com antioxidantes associados a nanopartículas reportaram a redução da produção de ROs e da degeneração celular na produção *in vitro* de embriões (REMIÃO et al., 2016). Outros estudos envolvendo a área da reprodução e nanotecnologias mostram que em ovócitos que estão em fase de desenvolvimento as nanopartículas atravessam a barreira protetora das células da teca, camadas celulares da granula e zona pelúcida (HOU e ZHU, 2017).

A taxa de clivagem e blastocistos não diferiu entre os tratamentos controle e nanopartículas de resveratrol. A concentração de resveratrol associado as nanopartículas ainda deve ser adaptada ao processo de maturação ovocitária sugerindo que a semelhança com o grupo controle pode estar associada a concentrações insuficientes. Já foi demonstrado que o

resveratrol diluído exerce efeitos anti-proliferação e pró-apoptóticos em concentrações mais elevadas (SZENDE; TYIHAK e KIRALY-VEGHELY, 2000; KUWAJERWALA et al., 2002). Também foi reportado que o resveratrol, dependendo da concentração em que foi adicionado ao meio de maturação, ocasionou uma inibição competitiva das atividades de várias fosfodiesterases, o que levou a um aumento na concentração de cAMP citosólico e o nível intracelular de  $Ca^{2+}$ , e posteriormente, atraso na maturação do oócito (PARK et al., 2012).

Também pode ser visto que a suplementação de resveratrol durante a MIV regula o estado bioenergético/redox dos ovócitos e a distribuição citoplasmática das organelas, como a proporção de mitocôndrias ativas e a concentração de ATP (PIRAS et al., 2019).

A produção de ROs avaliada pela intensidade de fluorescência emitida pela sonda DCF avaliada em microscopia confocal foi semelhante entre todos os tratamentos após a maturação ovocitária. Nos casos em que há uma alta produção de ROs durante a maturação ovocitária evidenciada pela marcação com DCF e também pelos níveis intracelulares de glutathiona, a viabilidade ovocitária pode estar comprometida por alteração na fosforilação oxidativa e conseqüentemente síntese de ATP, além da ocorrência de mudanças citogenéticas (HARVEY, 2007). Resultados contraditórios foram observados por outros autores em que o uso de antioxidantes em concentrações adequadas durante o processo de maturação *in vitro* resultaram em menor produção de ROs em diferentes espécies, o que foi relacionado a uma melhor qualidade ovocitária e embrionária (ZABIHI et al., 2019; KWAK et al., 2012).

Levando-se em conta que as ROs são produzidas naturalmente como consequência do metabolismo celular ou em desordens biológicas, e que quando o oócito é retirado do seu ambiente natural a defesa antioxidante é perdida, torna-se importante controlar a produção ROs durante a produção *in vitro* de embriões, avaliando a quantidade em que esta mesma proporção não afetara a eficácia desta biotecnologia. Além disso, também deve ser levado em consideração que fatores como a tensão de oxigênio durante a MIV estão ligados com o estresse oxidativo, que tem como consequência a diminuição intracelular do  $Ca^{2+}$ , o que influencia na ativação e fertilização do oócito (GIGLI et al., 2006; BANWELL et al., 2007; JIAO et al., 2013).

Os tratamentos não interferiram na taxa de maturação nuclear. Esses dados sugerem que as concentrações de nanopartículas mesoporosas de sílica ainda devem ser ajustadas para se observar seu efeito no processo de maturação. Resultado semelhante foi observado por Piras et al. (2018), ao estudaram o efeito do resveratrol em diferentes concentrações (1; 2,5 e

5  $\mu\text{M}$ ), adicionado durante o processo de maturação nuclear ovocitária de gatas. Eles concluíram que os tratamentos não alteraram a porcentagem de maturação, porém o uso do antioxidante foi eficiente para diminuir o nível de ROs, aumentar a taxa e o número de células nos blastocistos. Já Wang et al. (2019) observaram que ao utilizar o resveratrol na concentração de 5  $\mu\text{M}$  durante a maturação ovocitária de suínos, houve uma maior taxa de extrusão do corpúsculo polar em relação ao grupo controle e ao grupo em que foi utilizado 0,1  $\mu\text{M}$ .

Em relação a apoptose celular embrionária, avaliada pela marcação das células pelo iodeto de propídio, não houve diferença entre os tratamentos, resultado diferente do encontrado por Wang et al. (2019) em que o uso de resveratrol durante a maturação ovocitária foi relacionado a uma diminuição na morte programada das células através da regulação de genes envolvidos no processo.

Assim, uma das possíveis explicações para os resultados encontrados no presente estudo em relação à emissão de ROs, maturação nuclear ovocitária e apoptose celular embrionária para os quais não foi detectado efeito dos tratamentos, seria as concentrações utilizadas de resveratrol na forma diluída e associado as nanopartículas, as quais apresentaram pouca variação na concentração, diferente de outros estudos que as concentrações de resveratrol foram mais distantes uma das outras.

## **7 CONCLUSÃO**

Concluir-se que a suplementação do meio de maturação *in vitro* com o resveratrol diluído na concentração de 1  $\mu\text{M}$  é prejudicial para a taxa de clivagem e de formação de blastocistos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFRI, M. Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer: Part IV: Locating 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) in the lipid bilayer. **Chemistry and physics of lipids**, v. 131, n. 1, p. 123-133, 2004.

AGARWAL, A; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive biology and endocrinology**, v.3, n. 28, p. 1- 21, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1215514/>. Acesso em: 20 Fev. 2020. DOI: 10.1186/1477-7827-3-28.

ANDERSON, J. et al. Influences of material characteristics on ibuprofen drug loading and release profiles from ordered micro- and mesoporous silica matrices. **Chemistry of Materials**, v. 21, p. 4160-4167, 2004. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cm0401490>. Acesso em: 14 Jan. 2020. DOI: 10.1021/cm0401490.

ANDRADE, E. R. et al. 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. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v34n2/p79-86.pdf>. Acesso em: 02 Fev. 2019.

ARANDA, A. et al. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: A quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. **Toxicology in vitro**, v. 27, n. 2, p. 954-963, 2013.

ASSUMPCÃO, M. E. O. D. et al. Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros **Brazilian journal of veterinary research and animal science**, v. 39, n. 3, p. 149-156, 2002.

BANWELL, K. M. et al. Oxygen concentration during mouse oocyte *in vitro* maturation affects embryo and fetal development, **Human Reproduction**, v. 22, n. 10, p. 2768-2775, 2007. Disponível em: <https://academic.oup.com/humrep/article/22/10/2768/598682>. Acesso em: 10 Jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/humrep/dem203>.



CASTRO E PAULA, L. A.; HANSEN, P. J. Interactions between oxygen tension and glucose concentration that modulate actions of heat shock on bovine oocytes during in vitro maturation. **Theriogenology**, v. 68, p. 763-770, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X07003330>. Acesso em: 10 Dez. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.005>

CHAVES, R. N.; DUARTE, A. B. G.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J.R. Sistemas de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 1, p. 37- 49, 2010. Disponível em: <https://cbra.websiteseuro.com/pages/publicacoes/rbra/v34n1/p37-49.pdf>. Acesso em: 02 Fev. 2019.

CHAN, W. H. Resveratrol protects against 2-Bromopropane-induced apoptosis and disruption of embryonic development in blastocysts. **International Journal of Molecular Science**, v. 12, p. 4991-5010, 2011. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/12/8/4991>. Acesso em: 01 Fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms12084991>.

CHEN, H. et al. Resveratrol improved the developmental potential of oocytes after vitrification by modifying the epigenetics. **Molecular reproduction and development**, v. 86, n. 7, p. 862-870, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/mrd.23161#accessDenialLayout>. Acesso em: 01 Fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/mrd.23161>.

COELHO, L. A. et al. Fecundação in vitro de ovócitos bovinos com sêmen submetido a diferentes diluidores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 2, p. 397- 402, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbz/v29n2/5775.pdf>. Acesso em: 05 Abr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982000000200012>

COMBELLES, C. M. H.; GUPTA, S.; AGARWAL, A. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? **Reproductive Biomedicine On-line**, v. 18, n. 6, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1472648310600387>. Acesso em: 10 Nov. 2019. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60038-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60038-7).

CONTI, M; FRANCIOSI, F. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events. **Human Reproduction Update**, v. 24, n. 3, p. 245-266, 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/humupd/article/24/3/245/4844024>. Acesso em: 03 Ago. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx040>.

COUTO, J. C. et al. Maturação oocitária em bovinos: efeito dos ácidos graxos poli-insaturados. **Veterinária e Zootecnia**, 2017. Disponível em: <https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/issue/view/7/5>. Acesso em: 08 Jul. 2019.

CROCOMO, L. F. et al. Produção de embriões *in vitro*: estresse oxidativo e antioxidantes. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 4, p. 470- 479, 2012. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/141273/ISSN0102-5716-2012-19-04-470-479.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 27 Fev. 2020.

DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proceedings of the royal society B**, v.276, p.1737-1745, 2009. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/pdf/10.1098/rspb.2008.1791>. Acesso em: 14 Set. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1791>.

FARIN, C. E. et al. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 97-112, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432006004805>. Acesso em: 06 Dez. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.007>.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ramb/v43n1/2075.pdf>. Acesso em: 14 Dez. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014>.

FUJITANI, Y. et al. Effect of oxygen concentration and free radicals on in vitro development of in vitro- Produced Bovine Embryos. **Journal of animal Science**, v. 75, n. 2, p. 483-489,

1997. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/75/2/483/4624961>. Acesso em: 10 Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.2527/1997.752483x>.

GARCÍA-PÉREZ, M. E. et al. Picea mariana bark: A new source of trans-resveratrol and other bioactive polyphenols. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1173- 1182, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612008783>. Acesso em: 10 Mai. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.050>

GIGLI, I.; BYRD, D. D.; FORTUNE, J. E. Effects of oxygen tension and supplements to the culture medium on activation and development of bovine follicles in vitro. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 344-353, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X05005340> Acesso em: 07 Jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.11.021>

GONÇALVES, R. L. R.; VIANA, J. H. M. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 2, p. 156 -159, 2019. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1113394/1/RomanyRBRA2019.pdf>. Acesso em: 14 Set. 2019.

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 33, n. 2, p. 82-94, 2009. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/pag82-94.pdf>. Acesso em: 10 Nov. 2019.

GOTTARDI, P.F. et al. Efeito das células do cumulus e cisteamina durante o cultivo de maturação in vitro de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da competência para desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 2, p. 245-252, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v64n2/a01v64n2.pdf>. Acesso em: 01 Dez. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000200001>.

GUTNISKY, C. et al. Influence of hyaluronic acid synthesis and cumulus mucification on bovine oocyte in vitro maturation, fertilisation and embryo development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 3, p. 488-497, 2007. Disponível em: <https://www.publish.csiro.au/rd/rd06134>. Acesso em: 09 Out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD06134>.

HAO, N.; LI, L.; TANG, F. Shape matters when engineering mesoporous silica-based nanomedicines. **Biomaterials Science**, v. 4, n. 4, p. 575–591, 2016. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/bm/c5bm00589b/unauth#!divAbstract>. Acesso em: 07 Nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1039/c5bm00589b>.

HARVEY, A. J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Animal reproduction Science**, v. 98, p. 113-128, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432006004817>. Acesso em: 14 Nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.008>.

HARDY, K. Cell death in the mammalian blastocyst. **Molecular human reproduction**, v. 3, n. 10, p. 919-925, 1997. Disponível em: <https://academic.oup.com/molehr/article/3/10/919/1060720>. Acesso em: 10 Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/molehr/3.10.919>.

HARDY, K.; STARK, J.; WINSTON, R. M. L. Maintenance of the inner cell mass in human blastocysts from fragmented embryos. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1165-1169, 2003. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/68/4/1165/2683475>. Acesso em: 13 Nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010090>.

HASEGAWA, K. et al. Sirt1 protects against oxidative stress-induced renal tubular cell apoptosis by the bidirectional regulation of catalase expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 372, n. 1, p. 51-56, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X0800853X>. Acesso em: 02 Fev. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.176>.

HASHIMOTO, S. et al. Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. **Molecular Reproduction e Development**, v. 57, p. 353-360, 2000. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/1098-2795\(200012\)57:4<353::AID-MRD7>3.0.CO;2-R](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/1098-2795(200012)57:4<353::AID-MRD7>3.0.CO;2-R). Acesso em: 10 Out. 2019. DOI: [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200012\)57:4<353::AID-MRD7>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200012)57:4<353::AID-MRD7>3.0.CO;2-R).

HASHIMOTO, S. et al. Effects of cumulus cell density during in vitro maturation of the developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 49, n. 8, p. 1451-1463, 1998. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X98000910>. Acesso em: 10 Dez. 2019. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00091-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00091-0).

HODALI, H. A.; MARZOUQA, D. M.; TEKFA, F. Z. Evaluation of mesoporous silicate nanoparticles for the sustained release of the anticancer drugs: 5-fluorouracil and 7-hydroxycoumarin, **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 80, p. 417-425, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10971-016-4127-8>. Acesso em: 01 Fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10971-016-4127-8>.

HOU, C. C.; ZHU, J. Q. Nanoparticles and female reproductive system: how do nanoparticles affect oogenesis and embryonic development. **Oncotarget**, v. 8, n. 65, p. 109799-109817, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5752563/>. Acesso em: 17 Nov. 2019. DOI: [10.18632/oncotarget.19087](https://doi.org/10.18632/oncotarget.19087).

ITAMI, N. et al. Resveratrol improves the quality of pig oocytes derived from early antral follicles through sirtuin 1 activation. **Theriogenology**, v. 83, n. 8, p. 1360- 1367, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X15000497>. Acesso em: 10 Jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.01.029>.

JIAO, G. Z. et al. Developmental potential of prepubertal mouse oocytes is compromised due mainly to their impaired synthesis of glutathione. **Plos one**, v. 8, n. 3, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3585726/>. Acesso em: 13 Out. 2019. DOI: [10.1371/journal.pone.0058018](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058018).

KAPUSCINSKI, J. DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 70, n. 5, p. 220-233, 2009.

KARASAHIN, T.; ARIKAN, S. The effect of oleic and linoleic acids on in vitro bovine embryonic development and embryo quality. **Turkish journal of veterinary and animal sciences**, v. 39, p. 154-159, 2015. Disponível em: <http://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/issues/vet-15-39-2/vet-39-2-6-1404-18.pdf>. Acesso em: 10 Ago. 2019. DOI: 10.3906/vet-1404-18.

KARJA, N. W. K. et al. Effects of oxygen tension on the development and quality of porcine in vitro fertilized embryos. **Theriogenology**, v. 62, n. 9, p. 1585- 1595, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X04001128>. Acesso em: 15 Jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.03.012>

KHAN, I. et al. Polydatin improves the developmental competence of bovine embryos in vitro via induction of sirtuin 1 (Sirt1). **Reproduction, fertility and development**, 2017. Disponível em: <https://www.publish.csiro.au/rd/rd16302>. Acesso em: 30 Set. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD16302>.

KHAZAEI, M.; AGHAZ, F. Reactive oxygen species generation and use of antioxidants during In Vitro maturation of oocytes. **International journal of fertility and sterility**, v. 11, n. 2, p. 63-70, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5347452/>. Acesso em: 05 Dez. 2019. DOI: 10.22074/ijfs.2017.4995.

KIM, B. K. et al. 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. Disponível em: <http://www.dbpia.co.kr/Journal/articleDetail?nodeId=NODE01709723>. Acesso em: 10 Jun. 2019.

KREUTER, J. Nanoparticles-a historical perspective. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, n. 1, p. 1-10, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517306008878>. Acesso em: 11 Mai. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.021>.

KUWAJERWALA, N. et al. Resveratrol Induces Prostate Cancer Cell Entry into S Phase and Inhibits DNA Synthesis. **Cancer research**, v. 62, p. 2488-2492, 2002. Disponível em: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/62/9/2488.full-text.pdf>. Acesso em: 10 Jul. 2019.

KWAKA, S. S. et al. The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. **Theriogenology**, v. 78, p. 86-101, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X12000593>. Acesso em: 14 Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.01.024>

LANGCAKE, P.; CORNFORD, C. A.; PRYCE, R. J. Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. **Phytochemistry**, v. 18, n. 6, p. 1025-1027, 1979. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942200914705>. Acesso em: 11 Dez. 2019. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)91470-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)91470-5).

LANDIM-ALVARENGA, F. C.; CHOI, Y. H. In vitro maturation of equine oocytes without hormones. **Theriogenology**. v.51, p.383, 1999.

LEE K. et al. Effect of resveratrol on the development of porcine embryos produced in vitro. **Journal Reproduction Development**, v. 5, p.56-330, 2010. Disponível em: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/advpub/0/advpub\\_09-174K/\\_pdf/-char/ja](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/advpub/0/advpub_09-174K/_pdf/-char/ja) Acesso em: 15 Set. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1262/jrd.09-174K>

LEE, S. et al. Synergistic effects of resveratrol and melatonin on in vitro maturation of porcine oocytes and subsequent embryo development. **Theriogenology**, v. 114, p. 191-198, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X18301304>. Acesso em: 02 Dez. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.03.040>.

LEE, S. et al. Sonic hedgehog signaling mediates resveratrol to improve maturation of pig oocytes in vitro and subsequent preimplantation embryo development. **Journal of cellular physiology**, v. 233, p. 5023-5033, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jcp.26367>. Acesso em: 08 Out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.26367>.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, p.293-303, 2001. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Dulcineia\\_Abdalla2/publication/255635936\\_Peroxidacao\\_lipidica\\_mecanismos\\_e\\_avaliacao\\_em\\_amostras\\_biologicas/links/57688ac708ae8ec97a424752/Peroxidacao-lipidica-mecanismos-e-avaliacao-em-amostras-biologicas.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Dulcineia_Abdalla2/publication/255635936_Peroxidacao_lipidica_mecanismos_e_avaliacao_em_amostras_biologicas/links/57688ac708ae8ec97a424752/Peroxidacao-lipidica-mecanismos-e-avaliacao-em-amostras-biologicas.pdf). Acesso em: 10 Nov. 2019.

LIU, M. et al. Resveratrol protects against age-associated infertility in mice. **Human Reproduction**, v. 28, n. 3, p. 707-717, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23293221>. Acesso em: 14 Fev. 2019. DOI: 10.1093/humrep/des437.

LONERGAN, P. et al. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. **Molecular reproduction and development**, v. 57, n. 2, p. 146-152, 2000. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1098-2795\(200010\)57:2%3C146::AID-MRD5%3E3.0.CO;2-2](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1098-2795(200010)57:2%3C146::AID-MRD5%3E3.0.CO;2-2). Acesso em: 12 Mar. 2019. DOI: [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200010\)57:2<146::AID-MRD5>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200010)57:2<146::AID-MRD5>3.0.CO;2-2).

LÓPEZ-VÉLEZ, M. et al. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. **Critical reviews in food Science and nutrition**, v. 43, n. 2, p. 233-244, 2003. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10408690390826509?needAccess=true>. Acesso em: 26 Mar. 2020.



LUZ, H. K. M. et al. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 1-13, 2011. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/2890/289022024001.pdf>. Acesso em: 12 Set. 2019.

MORITA, Y. et al. 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. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1477-7827-10-14>. Acesso em: 10 Jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-14>.

MUKHERJEE, A. et al. Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 31, cap. 2, p. 229 -239, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10815-013-0116-9>. Acesso em: 08 Ago. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10815-013-0116-9>

PABON, J. E.; FINDLEY, W. E.; GIBBONS, W. E. The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. **Fertility and Sterility**, v. 51, n. 5, p. 896-900, 1989. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S001502821660688X>. Acesso em: 10 Set. 2019. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)60688-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)60688-X).

MAY-PANLOUP, P. et al. Mitochondrial DNA in the oocyte and the developing embryo. **Current topics in developmental biology**, v. 77, p. 51-83, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S007021530677003X>. Acesso em: 11 Ago. 2019. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(06\)77003-X](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(06)77003-X).

NAGAI, T. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v.55, p. 1291-1301, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X01004836>. Acesso em: 09 Jul. 2019. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00483-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00483-6).

PARK, S. J. et al. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. **Cell**, v. 3, p. 421-433, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286741200030X>. Acesso em: 11 Out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.017>.

PIRAS, A. R. et al. Resveratrol supplementation during in vitro maturation improves embryo development of prepubertal goat oocytes selected by brilliant cresyl blue staining. **Journal of reproduction and development**, 2018. Disponível em: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/65/2/65\\_2018-077/\\_pdf/-char/ja](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/65/2/65_2018-077/_pdf/-char/ja). Acesso em: 16 Nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1262/jrd.2018-077>.

PIRAS, A. R. Resveratrol supplementation during in vitro maturation: effect on the quality of oocytes in species of veterinary interest . **Dipòsit digital de documents de la UAB**, 2019. Disponível em: <https://ddd.uab.cat/record/213690>. Acesso em: 11 Jan. 2020.

REMIÃO, M. H. et al. Melatonin delivery by nanocapsules during in vitro bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. **Reproductive Toxicology**, v. 63, p. 70-81, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0890623816301228>. Acesso em: 08 Set. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.05.016>

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Journal Bioscience**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6617/4350>. Acesso em: 11 Ago. 2019.

ROBB, E. L. et al. 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. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X0702801X>. Acesso em: 15 Mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.138>.

RUDER, E. H.; HARTMAN, T. J.; BLUMBERG, J.; GOLDMAN, M. B. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. **Human Reproduction**, v.14, n.4, p. 345-357, 2008. Disponível em: <https://academic.oup.com/humupd/article/14/4/345/638903>. Acesso em: 14 Nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn011>.

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. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpb/2013/00000014/00000010/art00009>. Acesso em: 10 Fev. 2019.

SARIKAYA, M.; TAMERLER, C.; Y. JEN, A.; SCHULTEN, K.; BANEYX, F. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. **Nature materials**, v. 2, p. 577-585, 2003. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nmat964#citeas>. Acesso em: 08 Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmat964>.

SHEN, D. et al. Biphasic stratification approach to three-dimensional dendritic biodegradable mesoporous silica nanospheres. **Nano Lett**, v. 14, p. 923-932, 2014. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/nl404316v>. Acesso em: DOI: <https://doi.org/10.1021/nl404316v>

SHI, P.; GUSTAFSON, J. A.; MACKAY, J. A. Genetically engineered nanocarriers for drug delivery. **International Journal of nanomedicine**, v. 9, p. 1617-1626, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3970941/pdf/ijn-9-1617.pdf>. Acesso em: 10 Fev. 2020. DOI: 10.2147/IJN.S53886

SILVA, C. M. G. et al. Influência da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo in vitro de folículos e embriões. **Revista brasileira de reprodução animal**, Belo Horizonte, v.34, n.4, p. 233-242, 2010. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v34n4/p233-242.pdf>. Acesso em: 09 Jan. 2020.

SLOWING, I. I.; TREWYN, B. G.; LIN, V. S.-Y. Mesoporous silica nanoparticles for intracellular delivery of membrane-impermeable proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 8845-8849, 2007. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja0719780>. Acesso em: 10 Dez. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja0719780>.

SOVERNIGO, T. C. et al. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. **Reproduction in domestic animals**, v. 52, n. 4, p. 561-569, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/rda.12946>. Acesso em: 14 Nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.12946>

SUGIYAMA, M. et al. Resveratrol-induced mitochondrial synthesis and autophagy in oocytes derived from early antral follicles of aged cows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 61, n. 4, p. 251-259, 2015. Disponível em: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/advpub/0/advpub\\_2015-001/\\_pdf/-char/ja](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/advpub/0/advpub_2015-001/_pdf/-char/ja). Acesso em: 10 Mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1262/jrd.2015-001>.

SZENDE, B. et al. Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures. **Experimental e molecular medicine**, v. 32, p. 88-92, 2000. Disponível em: <https://rdcu.be/b2fN5>. Acesso em: 10 Dez. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/emm.2000.16>.

TAKEO, S. et al. Resveratrol improves the mitochondrial function and fertilization outcome of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 60, n. 2, p. 92-99, 2014. Disponível em: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/advpub/0/advpub\\_2013-102/\\_pdf/-char/ja](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/advpub/0/advpub_2013-102/_pdf/-char/ja). Acesso em: 08 Mai. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1262/jrd.2013-102>.

TAM, P. P. Postimplantation development of mitomycin C-treated mouse blastocysts. **Teratology**, v. 37, p. 205-212, 1988. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/tera.1420370305>. Acesso em: 14 Set. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/tera.1420370305>.

THOMPSON, J.G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p.263-275, 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432000000968>. Acesso em: 14 Ago. 2019. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00096-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00096-8).

THOMPSON, J. G. E.; SIMPSON, A. C.; PUGH, P. A.; DONNELLY, P. E.; TERVIT, H. R. Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. **Journal of reproduction and fertility**, v. 89, p. 573-578, 1990. Disponível em: [https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/89/2/jrf\\_89\\_2\\_023.xml](https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/89/2/jrf_89_2_023.xml). Acesso em: 14 Ago. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0890573>.

TRINDADE, M. C. et al. Estresse oxidativo na produção in vitro de embriões bovinos: revisão de literatura. **Revista Investigação**, v. 15, n. 1, p. 37-45, 2016. Disponível em: <http://publicacoes.unifran.br/index.php/investigacao/article/view/1075/834>. Acesso em: 15 Jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.26843/investigacao.v15i1.1075>.

VALLET-REGI, M. et al. Drug confinement and delivery in ceramic implants. **Drug Metabolism Letters**, p. 37-40, 2007. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Francisco\\_Balas/publication/233565172\\_Drug\\_Confinement\\_and\\_Delivery\\_in\\_Ceramic\\_Implants/links/0deec537b484133e2c000000/Drug-Confinement-and-Delivery-in-Ceramic-Implants.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Francisco_Balas/publication/233565172_Drug_Confinement_and_Delivery_in_Ceramic_Implants/links/0deec537b484133e2c000000/Drug-Confinement-and-Delivery-in-Ceramic-Implants.pdf). Acesso em: 14 Jun. 2019. DOI: [10.2174/187231207779814382](https://doi.org/10.2174/187231207779814382).

VAZQUEZ, N. I. et al. Synthesis of mesoporous silica nanoparticles by sol-gel as nanocontainer for future drug delivery applications. **Boletín de la sociedad española de cerámica y vidrio**, v. 56, n. 3, p. 139-145, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0366317517300225>. Acesso em: 10 Mai. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2017.03.002>.

VIANA, J. H. M. et al. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 1, p. 12-18, 2012. Disponível em: <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a605ef7783717068b470d/pdf/animreprod-9-1-12.pdf>. Acesso em: 05 Mar. 2019.

VIANA, J. H. M. et al. A historical perspective of embryo-related technologies in South America. **Animal Reproduction**, v. 15, p. 963-970, 2018. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1096736/1/fulltext.pdf>. Acesso em: 08 Nov. 2019. DOI: 10.21451/1984-3143-AR2018-0016

WAI, T. et al. The Role of Mitochondrial DNA Copy Number in Mammalian Fertility. **Biology of reproduction**, v. 83, n. 1, p. 52-62, 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/83/1/52/2530092>. Acesso em: 10 Jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080887>.

WANG, F. et al. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. **Fertility and sterility**, v. 101, n. 2, p. 577-586, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0015028213032044>. Acesso em: 02 Set. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.10.041>.

WANG, S. et al. Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0955286313002118>. Acesso em: 22 Mai. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.10.002>.

WANG, X. et al. 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. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S001502820204236X>. Acesso em: 12 Dez. 2019. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04236-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04236-X).

WANG, X. et al. 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. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/rda.13493>. Acesso em: 10 Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.13493>

WU, B. et al. Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and cumulus cells during maturation in vitro of bovine oocytes. **Molecular reproduction and development**, v. 45, p. 560-565, 1996.

ZABIHI, A.; et al. Resveratrol addition to in vitro maturation and in vitro culture media 1 enhanced developmental competence of sheep embryos. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 68, p. 25-31, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0739724019300013>. Acesso em: 14 Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2018.12.010>.