

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Efeito da suplementação de beta-NGF no meio de maturação ovocitária *in vitro* sobre a estrutura citoplasmática do ovócito bovino

Maria Júlia Araújo Lopes

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia
Agosto/2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Efeito da suplementação de Beta-NGF no meio de maturação ovocitária *in vitro* sobre a estrutura citoplasmática do ovócito bovino

Maria Júlia Araújo Lopes

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Co-orientador: Me. Muller Carrara Martins

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia
Agosto/2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Efeito da suplementação de Beta-NGF no meio de maturação ovocitária *in vitro* sobre a estrutura citoplasmática do ovócito bovino

Maria Júlia Araújo Lopes

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Co-orientador: Me. Muller Carrara Martins

Homologado pela coordenação do curso de
Biotecnologia em __/__/____

Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior

Uberlândia – MG
Agosto/2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Efeito da suplementação de Beta-NGF no meio de maturação ovocitária *in vitro* sobre a estrutura citoplasmática do ovócito bovino

Maria Júlia Araújo Lopes

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: ____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, de de

*Dedico esse trabalho aos meus familiares,
que me deram a base para crescer e
alcançar meus objetivos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por me dar saúde e por todos os privilégios que me permitiram escrever esse trabalho.

Agradeço aos meus pais, Maria Sônia e Luiz Adão, e meu irmão, João Paulo, por me criarem com tanto amor e sempre priorizarem e incentivarem a minha educação. Agradeço a minha prima Isabela, que nunca me deixou desistir e sempre acreditou em mim.

Agradeço ao meu orientador, Marcelo Beletti, por todos os ensinamentos e pelo privilégio de desenvolver meu trabalho de conclusão de curso ao seu lado. Estendo esse agradecimento ao meu coorientador, Muller Carrara, que foi meu parceiro durante toda a execução desse projeto.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Vitória, Laura, Kamila, Heitor e, especialmente, a Luisa Miglio, que me ensinou todos os procedimentos desde o princípio e que sempre foi ao meu auxílio quanto precisei.

Agradeço a Natália, ao Lucas e a todos que já estiveram envolvidos na pesquisa com Beta-NGF, por acreditarem nesse projeto e por possibilitarem que esse trabalho fosse realizado.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) que financiou esse projeto, tornando sua execução possível.

Agradeço as técnicas Mariari e Layane, que me auxiliaram, com tanta paciência, em todos os processos das microscopias analisadas.

Por fim, agradeço a Jully, por me dar forças para escrever esse trabalho, por me ensinar a reclamar menos e viver mais e por me mostrar que a vida é muito mais do que os olhos veem. Que meu agradecimento chegue onde estiver.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Análise estatística dos dados obtidos a partir da emissão de fluorescência com diferentes marcadores. Marcação com Mitotracker apenas no ovócito (A). Marcação com Mitotracker no CCO (B). Marcação com DCF no CCO (C). Marcação com Iodeto de propídeo no CCO (D). Marcação com Yo-Pro-1 no CCO (F). *= diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$)..... 17
- Figura 2.** CCOs marcados com Mitotracker com sobreposição de "slices" (2A) sem e (2B) com suplementação. Fonte: autoria própria 18
- Figura 3.** Ovócitos marcados com Mitotracker com sobreposição de "slices" (3A) sem suplementação e (3B) com suplementação. Fonte: autoria própria 18
- Figura 4.** CCOs marcados com DCF com sobreposição de "slices" (4A) sem e (4B) com suplementação. Fonte: autoria própria 19
- Figura 5.** CCOs marcados com iodeto de propídeo com sobreposição de "slices" (5A) sem e (5B) com suplementação. Fonte: autoria própria 19
- Figura 6.** CCOs marcados com Yo-Pro-1 com sobreposição de "slices" (6A) sem e (6B) com suplementação. Fonte: autoria própria 20

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Média dos valores de emissão de fluorescência de cada marcador no grupo sem suplementação (controle) e com suplementação (Beta-NGF).....	16
---	----

LISTA DE ABREVIACÃO

ATP	Adenosina trifosfato
CC	Células do cumulus
CCO	Complexo cumulus-oóforo
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
DCF	2'7'-diclorofluoresceína
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GVBD	Ruptura da vesícula germinativa
IP	Iodeto de propídeo
LH	Hormônio luteinizante
MII	Meiose II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mRNA	RNA mensageiro
mtDNA	DNA mitocondrial
NGF	Fator de crescimento neuronal
OIF	Fator de indução de ovulação
OPU	Aspiração folicular
PB	Corpúsculo polar
PBS	Tampão fosfato-salino
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
RNA	Ácido ribonucleico
TCM	Tissue Culture Medium
TE	Transferência de embrião

RESUMO

A bovinocultura, tanto de corte como de leite, são importantes atividades na cadeia produtiva de proteínas no Brasil. Por isso, buscam-se biotecnologias que melhorem a qualidade dessas produções, como é o caso da produção *in vitro* de embriões (PIVE). Uma fase importante para a PIVE é a maturação *in vitro* dos ovócitos, pois é o momento em que ocorre transformações que influenciam diretamente a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial. Recentemente foi descrito que a adição de Beta-NGF (*Nerve growth factor*) no meio de maturação ovocitária aumenta a eficiência da PIVE em bovinos. O presente estudo avaliou a estrutura citoplasmática de ovócitos maturados *in vitro*, com e sem suplementação de beta-NGF, por meio da análise de mitocôndrias, espécies reativas de oxigênio (EROs), apoptose e necrose celular. Os resultados mostraram que a suplementação induziu o aumento na atividade mitocondrial, além de reduzir a produção de EROs e consequentemente da apoptose e morte celular. Assim, é possível concluir que a suplementação com Beta-NGF atua de forma positiva na maturação citoplasmática de ovócitos.

Palavras-chave: fator de crescimento nervoso, maturação citoplasmática e produção *in vitro* de embriões

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivo específico	12
3. METODOLOGIA	12
3.1 Maturação in vitro	12
3.1.1 Suplementação com beta-NGF	13
3.1.2 Obtenção e seleção de CCOs	13
3.1.3 Maturação in vitro dos ovócitos	13
3.2 Microscopia confocal	14
3.2.1 Mitocôndrias	14
3.2.2 Espécies reativas de oxigênio	15
3.2.3 Apoptose e morte celular	15
3.3 Estatística	16
4. Resultados	16
4.1 Microscopia Confocal	16
4.1.1 Mitocôndrias	17
4.1.2 Espécies Reativas de Oxigênio	18
4.1.3 Apoptose e morte celular	19
5. Discussão	20
6. Conclusão	22
7. Referências	22

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma tecnologia reprodutiva assistida que começou a ser utilizada comercialmente em bovinos a partir de 1990 (VIZONÁ *et al.*, 2020). Cinco anos depois, apesar de sua complexidade e alto custo, o Brasil foi considerado o maior produtor mundial de embriões bovinos e referência na utilização da PIVE em escala comercial (VIANA *et al.*, 2012). Em 2019, a produção mundial de embriões *in vitro* foi de 1.031.567, sendo que 29% foram produzidos no Brasil (VIANA, 2020). Essa alta exploração da tecnologia no Brasil pode ser explicada pela necessidade de se aumentar a eficiência e produtividade da bovinocultura, já que o país se destaca mundialmente como produtor de proteína bovina. A aspiração folicular juntamente com a PIVE surge como uma alternativa para se alcançar um maior número de embriões em um menor período de tempo. Além disso também permite a implantação de ovócitos de fêmeas saudáveis com alto valor genético em receptoras com valor genético limitado (MELLO *et al.*, 2016).

Desta forma, a PIVE possui como principais aplicações a possibilidade de realizar melhoramento genético animal, pesquisas envolvendo a fecundação de gametas e o desenvolvimento embrionário inicial, a formação de um banco de germoplasma e, por fim, a reprodução assistida de fêmeas que possuem alto valor genético (GODDARD; HAYES; MEUWISSEN, 2010). Para a produção *in vitro* de embriões tem-se como principais fases a coleta dos ovócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV), cultivo *in vitro* (CIV) e transferência de embriões (TE) produzidos *in vitro* (OLIVEIRA *et al.*, 2014). A obtenção dos ovócitos pode ocorrer por meio de animais vivos ou por aspiração *post mortem*. No primeiro cenário, é realizada a aspiração transvaginal guiada por ultrassonografia (*Ovum Pick Up* - OPU) (BUENO; BELTRAN, 2008). Já no *post mortem*, utiliza-se a técnica de *slashing* (W. M. SALEH, 2017) ou a punção folicular nos ovários extraídos (MELLO *et al.*, 2016). A eficiência desse processo influencia diretamente a qualidade do complexo cúmulo-oóforo (CCO). A maturação é uma etapa de extrema importância, pois é o momento em que ocorre a transformação nuclear e citoplasmática que promovem diretamente mudanças estruturais e bioquímicas, viabilizando a fecundação (PEIXER *et al.*, 2018).

A maturação nuclear é marcada pela retomada da meiose e a primeira mudança morfológica é o rompimento da vesícula germinativa (*Germinal Vesicle Breakdown* - GVBD). Além disso, tem-se a formação dos fusos mitóticos e o alinhamento dos cromossomos

bivalentes, seguido da emissão do primeiro corpúsculo polar (*Polar body* - PB) contendo um conjunto de cromossomos (PAN; LI, 2019). Desta forma, o ovócito inicia a segunda divisão meiótica e pausa na metáfase da meiose II (MII) até a fertilização (FAN; SUN, 2019). Na maturação citoplasmática, ocorre o armazenamento de RNAs mensageiros (mRNAs), proteínas e fatores de transcrição que são necessários para a maturação, fertilização e embriogêneses inicial, além de alterações na dispersão e morfofisiologia das organelas (MAO *et al.*, 2014). É necessário um maior entendimento na função das mitocôndrias na maturação, uma vez que essas são responsáveis pela produção de adenosina trifosfato (ATP), pelo controle de íons Ca^{2+} , pela redução da homeostase e participam da reação em cadeia da apoptose (DUMOLLARD *et al.*, 2007). A produção de ATP via mitocôndria, utiliza o oxigênio como aceptor final de elétrons. Como consequência desse processo, tem-se a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que quando em excesso, irão causar estresse oxidativo nas células, danos no DNA, RNA, proteínas e funções mitocondriais, inibem a fecundação do ovócito pelo espermatozoide e pode levar a morte celular (AITKEN *et al.*, 1993; COMPORTI, 1989; GUERIN *et al.*, 2001).

O papel das células do cúmulo (CC) na maturação também precisam de destaque, uma vez que atuam como mediadoras da transferência de mRNAs, proteínas, substratos e nutrientes para o ovócito, afetando diretamente a competência do desenvolvimento ovocitário (SUN; YEH, 2021). Ademais, a remoção das CC pode induzir uma diminuição nas taxas de fertilização, uma vez que estão associadas à capacitação espermática e construção de uma camada protetora que previne alterações na zona pelúcida (ZP) (BUENO; BELTRAN, 2008). Ainda na maturação citoplasmática, tem-se a reorganização das organelas, no qual a mitocôndria, os ribossomos, o retículo endoplasmático, os grânulos corticais e o complexo de Golgi mudam de posição durante a transição do estágio de vesícula germinativa para MII e essas modificações são essenciais para que o ovócito adquira um alto potencial de desenvolvimento (FAN; SUN, 2019; MAO *et al.*, 2014). A maturação *in vitro* tem duração de 20 a 24h e a estimativa é que 85% a 90% dos ovócitos consigam atingir a MII, porém nem sempre a maturação do citoplasma acompanha a maturação nuclear e isso é primordial para a fertilização (FERRÉ *et al.*, 2020; PEIXER *et al.*, 2018).

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de baratear e aumentar a eficiência da OPU e da PIVE por meio de diversas estratégias, entre elas a suplementação dos meios de cultivo (PEIXER *et al.*, 2018), inclusive no meio de maturação. Isso torna-se necessário devido à baixa taxa de conversão dos ovócitos maturados em blastocisto, que

segundo Mello (2016) é de apenas 30%. Recentemente, um estudo identificou diversas proteínas do espermatozoide bovino que possuem alta correlação com a fertilização e com o desenvolvimento embrionário inicial *in vitro*, entre eles a subunidade beta do fator de crescimento do nervo ou “Beta-nerve growth factor” (Beta-NGF) (SILVA, 2018). O beta-NGF também foi descrito como fator de indução de ovulação (OIF), podendo estar envolvido com a ovulação e o desenvolvimento do corpo lúteo (EL ALLALI *et al.*, 2017).

Por isso, torna-se necessário estudos utilizando suplementação de beta-NGF nos meios da PIVE. Arle (2019) demonstrou que a suplementação de 100ng/mL de beta-NGF no meio de MIV melhora os resultados de PIVEs em bovino. Assim, exposto a importância do processo de maturação para a produção *in vitro* de embriões e a ação benéfica do beta-NGF nesta etapa, entende-se a importância de estudar o efeito da suplementação de beta-NGF na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a estrutura citoplasmática de ovócitos bovinos maturados *in vitro* com e sem suplementação com Beta-NGF no meio de maturação ovocitária normalmente utilizado na produção *in vitro* de embriões.

2.2 Objetivo específico

- Avaliar, através de microscopia confocal, a atividade mitocondrial, presença de EROs e taxa de apoptose e necrose celular após a maturação ovocitária com e sem suplementação de beta-NGF.

3. METODOLOGIA

3.1 Maturação *in vitro*

3.1.1 Suplementação com beta-NGF

Foram utilizados 65 complexos CCO, sendo 36 suplementados com 100ng/mL de Beta-NGF (Thermo Fisher Scientific 11050HNAC) e 29 controles, sem suplementação. Os tratamentos foram realizados em placas contendo 7 gotas de 100µL de meio de maturação, separadas fisicamente por 3mL de óleo mineral, com o intuito de diminuir o efeito de fatores não controlados.

3.1.2 Obtenção e seleção de CCOs

Os ovários provenientes de vacas abatidas foram doados pelo abatedouro comercial Frigorífico Santa Lúcia na rua Júlio César de Souza, número 970, bairro Bosque na cidade de Araguari (MG). Esses foram armazenados em garrafas térmicas contendo soro fisiológico a 37°C e transportados imediatamente para o Laboratório de Biologia da Reprodução do ICBIM-UFU. Após lavar os ovários com solução salina, os mesmos foram mantidos em banho maria a 37°C para aspiração folicular.

Os folículos antrais ovarianos foram aspirados com o auxílio seringas de 10mL e agulha 18G e o fluido aspirado foi transferido para tubos de fundo cônico de 50mL para a sedimentação por 15 minutos. Utilizou-se uma pipeta de Pasteur para depositar o sedimento em placas de poliestireno de 90x15mm e o rastreamento dos CCOs foi realizado com auxílio de microscópio estereoscópico. Os CCOs rastreados foram depositados em uma placa de poliestireno de 35x15mm, contendo meio de lavagem TCM – 199 HEPES (0,2mM piruvato sódico, 10mM HEPES ácido, 10mM HEPES sódico, 5mM bicarbonato de sódio, 83µg/mL de amicacina, suplementado com 10% de soro fetal bovino). Em seguida, selecionou-se os CCOs classificados como grau I e II de acordo com a classificação de Stojkovic (2001), ou seja, aqueles em que os ovócitos apresentaram citoplasma homogêneo, com ausência de vacúolos, distribuição homogênea e altamente presente das células do cumulus com mais de três camadas.

3.1.3 Maturação in vitro dos ovócitos

Os CCOs selecionados foram contados e depositados em uma nova placa de poliestireno de 90x15mm, onde cada gota foi lavada em 100µL de meio de lavagem TCM – 199 separando-as em tratamentos. Uma última lavagem foi realizada em gotas de 100µL de meio de maturação TCM 199 com bicarbonato (0,2mM piruvato sódico, 26mM bicarbonato de sódio, 83µg/mL de

amicacina, 1µg/mL FSH, 5µg/mL LH, suplementado com 10% de soro fetal bovino). Por fim, os CCOs foram transferidos para a placa de maturação contendo 2 gotas controle e 5 gotas suplementadas, na qual foram colocados 15 CCOs por gota de 100µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral em placas de petri de poliestireno de 35x15 mm, e foram mantidos por cerca de 22 h em estufa na temperatura de 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂.

3.2 Microscopia confocal

A microscopia confocal foi utilizada para avaliação da maturação citoplasmática de 65 CCOs após o período de maturação *in vitro*, sendo 36 suplementados com Beta-NGF e 29 controles (sem suplementação), em que foram avaliados os seguintes parâmetros: atividade mitocondrial, EROs, apoptose e morte celular. Os ovócitos foram corados com sondas fluorescentes específicas e a captura das imagens foi realizada utilizando o microscópio Zeiss® (LSM 510 meta) e o software ZEN 2009. As imagens foram adquiridas com objetiva de 20x, no modo Z-Stack, utilizando lasers de excitação específicos para cada sonda, respeitando os seguintes comprimentos de onda: 543nm para MitoTracker; 488nm para DCF; 488nm para YOPRO-01 e 488nm para iodeto de propídeo.

A avaliação quantitativa da fluorescência foi realizada por análise de imagem computacional por meio de um algoritmo desenvolvido em ambiente de programação Scilab.

3.2.1 Mitocôndrias

Para a quantificação a atividade mitocondrial foram analisados 11 ovócitos sem suplementação e 7 com suplementação. Os CCOs maturados foram transferidos para microgotas de 200µL de solução contendo 2µL de MitoTracker Orange M-7510 (554/576) em concentração de 1mM e 2mL de meio de maturação TCM 199 com bicabornato. Em seguida foram incubados por 30 minutos em estufa na temperatura de 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂. Após incubação, as estruturas foram lavadas três vezes em PBS com 2% de soro fetal bovino à 37°C. Os CCOs foram então depositados em solução de Paraformaldeído 4% por 12 horas e em seguida colocados em lâminas de vidro com 20µL de glicerina, cobertos com lamínula e selados com esmalte.

3.2.2 Espécies reativas de oxigênio

Para a produção de EROs, foram analisados 6 ovócitos sem suplementação e 14 com suplementação. Inicialmente, depositou-se os CCOs maturados em microgotas de 200 μ L de solução contendo 2 μ L de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (504/529) em concentração de 1mM e 2mL de meio de maturação TCM 199 com bicabornato. Em seguida foram incubados por 30 minutos em estufa na temperatura de 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂. Após incubação, as estruturas foram lavadas três vezes em PBS com 2% de soro fetal bovino à 37°C. Os CCOs foram então depositados em solução de Paraformaldeído 4% por 12 horas e em seguida colocados em lâminas de vidro com 20 μ L de glicerina, cobertos com lamínula e selados com esmalte.

3.2.3 Apoptose e morte celular

Para avaliar as taxas de apoptose e morte celular foram utilizados 12 ovócitos para controle e 17 e 15 dos CCOs, os mesmos, após maturação, foram depositados em microgotas de 100 μ L de solução de iodeto de propídeo (IP) (493/636) diluído em PBS na concentração de 2,0 μ g/mL e então incubados por 30 minutos em estufa na temperatura de 38,5°C, com 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, os CCOs foram incubados novamente, nas mesmas condições, por 30 minutos em microgotas de 100 μ L formadas por solução de YOPRO-01 (491/509) diluído em PBS 1% na concentração de 30 nM à 37°C. Os CCOs foram então depositados em solução de Paraformaldeído 4% por 30 minutos e em seguida colocados em lâminas de vidro com 20 μ L de meio de montagem (água destilada, glicerol e Hoescht), cobertos com lamínula e selados com esmalte.

3.2.4 Quantificação da fluorescência

Utilizando o software ZEN foi realizada a sobreposição de todas as imagens (“slices”) capturadas no modo Z-stack na avaliação de cada CCO, resultando uma única imagem, a qual foi salva em extensão BMP. Posteriormente foi realizada a segmentação do CCO ou do ovócito de forma interativa, para finalmente ser avaliada pelo algoritmo desenvolvido em ambiente Scielab. Este algoritmo transformou a imagem colorida em tons de cinza e quantificou a fluorescência realizando a soma dos valores de pixel, que vai de zero a 255, que compunha a imagem. Portanto, a intensidade de fluorescência não possui unidade.

3.3 Estatística

Os dados quantitativos foram inicialmente avaliados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se a distribuição dos dados era normal ($p \leq 0,05$). Como os dados apresentaram distribuição normal, optou-se pelo teste t de Student para verificar se existia diferença entre os dois tratamentos.

4. Resultados

4.1 Microscopia Confocal

Os dados obtidos a partir da análise da fluorescência estão expostos na tabela 1, enquanto a representação gráfica está apresentada na Figura 1.

Tabela 1. Média dos valores de emissão de fluorescência de cada marcador no grupo sem suplementação (controle) e com suplementação (Beta-NGF)

	Controle	Beta-NGF	p
MitoTracker CCO	88.400	160.275	0,0750
MitoTracker	19.937	33.216	0,0424
Ovócito*			
DCF*	24.787	15.429	0,0445
IP*	15.217	1.277	0,0001
Yo-Pro-1*	58.160	36.462	0,0027

*Marcadores que apresentaram diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$)

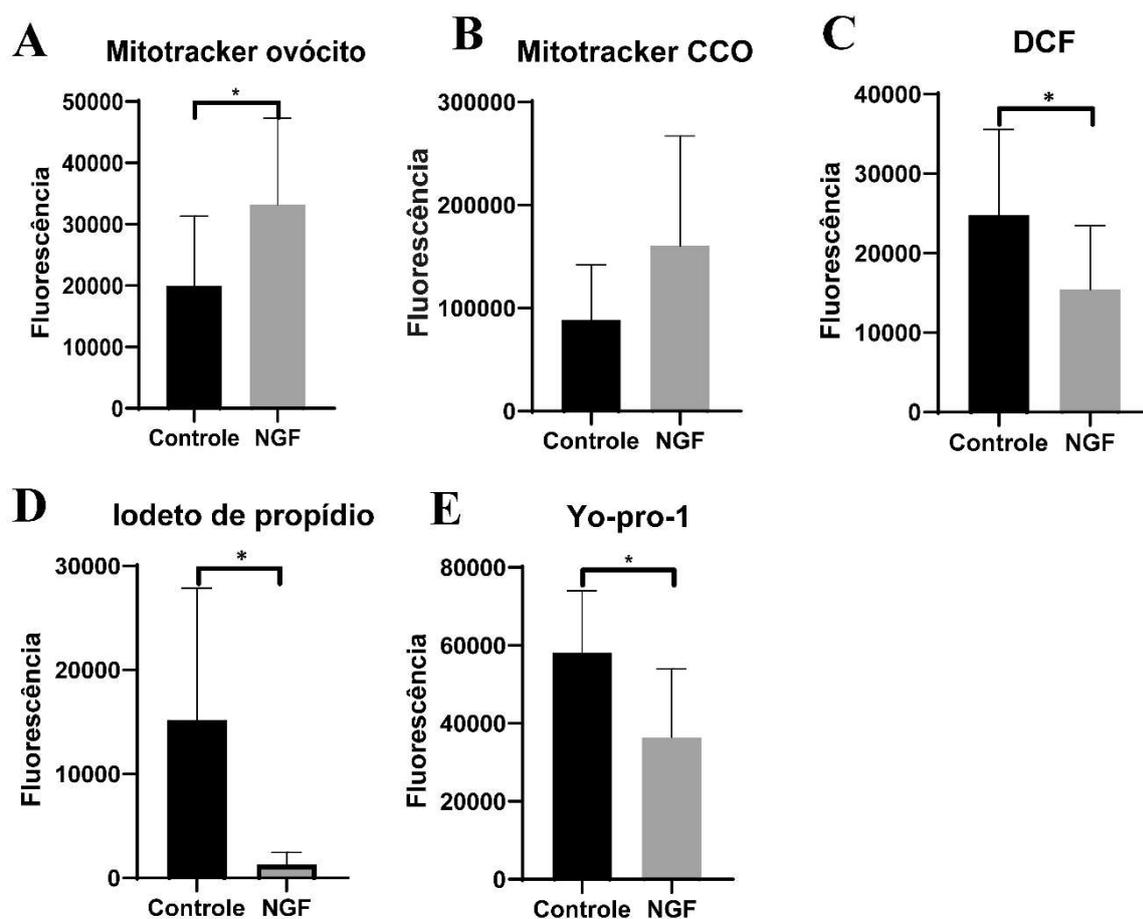


Figura 1. Análise estatística dos dados obtidos a partir da emissão de fluorescência com diferentes marcadores. Marcação com Mitotracker apenas no ovócito (A). Marcação com Mitotracker no CCO (B). Marcação com DCF no CCO (C). Marcação com Iodeto de propídeo no CCO (D). Marcação com Yo-Pro-1 no CCO (E). *= diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$)

4.1.1 Mitocôndrias

Foram obtidas a fluorescência apenas do ovócito e do CCO (Figura 2 e 3, respectivamente). Em ambos os casos, o valor numérico da fluorescência observado no grupo com Beta-NGF foi superior quando comparada com o grupo controle (Figura 1A e 1B). Sendo que no primeiro caso, os ovócitos sem suplementação emitiram uma fluorescência de 88.400, enquanto os com suplementação a emissão foi de 160.275. No segundo caso, a emissão do grupo controle foi de 19.937 e do Beta-NGF foi de 33.216. Entretanto, apenas na análise do ovócito sem as células do cumulus houve diferença estatística ao nível de 5% pelo teste t.

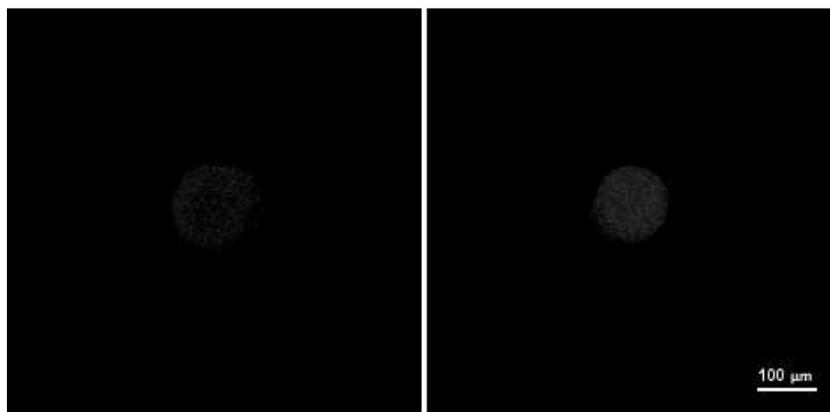


Figura 2. Ovócitos marcados com Mitotracker com sobreposição de "slices" (2A) sem e (2B) com suplementação. Fonte: autoria própria

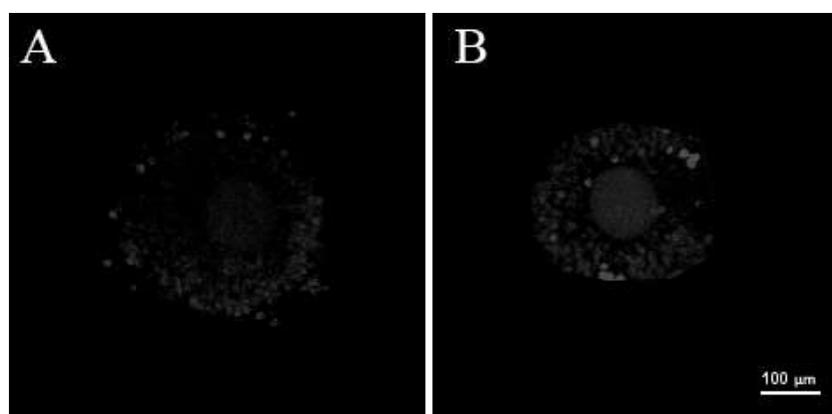


Figura 3. CCOs marcados com Mitotracker com sobreposição de "slices" (3A) sem suplementação e (3B) com suplementação. Fonte: autoria própria.

4.1.2 Espécies Reativas de Oxigênio

Na figura 4 tem-se as imagens capturadas dos ovócitos corados com DCF. No grupo controle, a emissão de fluorescência foi de 24.787, enquanto no grupo com Beta-NGF a emissão foi de 15.429 (Figura 1C). A partir dos dados, foi possível observar uma diferença estatística ao nível de 5% pelo teste t entre os grupos analisados.

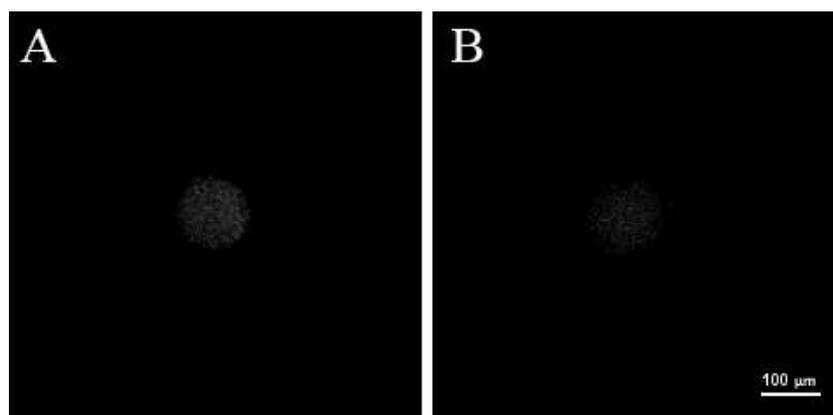


Figura 4. CCOs marcados com DCF com sobreposição de "slices" (4A) sem e (4B) com suplementação. Fonte: autoria própria

4.1.3 Apoptose e morte celular

Na avaliação da taxa de apoptose e morte celular, realizou-se a coloração com IP e com Yo-Pro-1 (Figura 5 e 6, respectivamente). Em ambas colorações foram analisados 12 ovócitos no grupo controle. Utilizou-se 17 ovócitos para a análise do grupo com Beta-NGF corados com IP, sendo que no controle a emissão de fluorescência foi 15.217 e no tratamento foi 1.277 (Figura 1D). Na coloração com Yo-Pro-1 foram analisados 15 ovócitos com suplementação, de forma que a emissão de fluorescência no controle foi de 58.160 e com Beta-NGF foi de 36.462 (Figura 1E). Em ambas as análises houve diferença estatística ao nível de 5% pelo teste t.

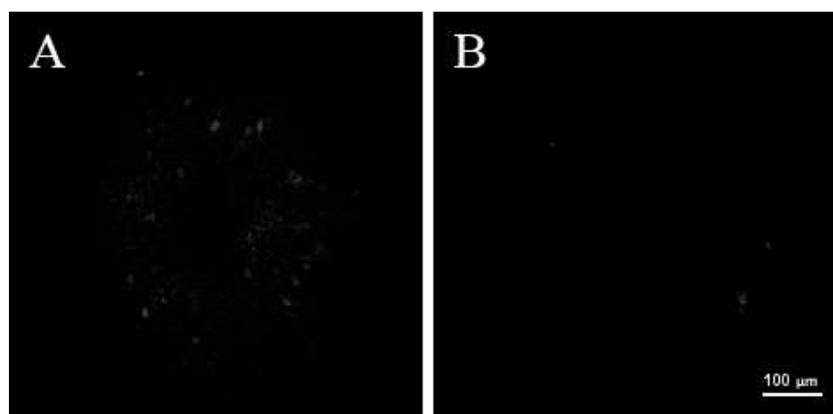


Figura 5. CCOs marcados com iodeto de propídeo com sobreposição de "slices" (5A) sem e (5B) com suplementação. Fonte: autoria própria

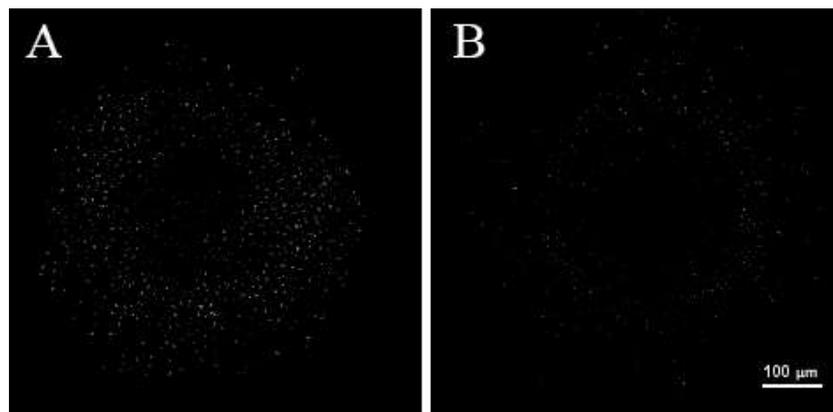


Figura 6. CCOs marcados com Yo-Pro-1 com sobreposição de "slices" (6A) sem e (6B) com suplementação.
Fonte: autoria própria

5. Discussão

O presente estudo avaliou a ação do Beta-NGF no processo de maturação *in vitro* do complexo cumulus-ovócito de fêmeas bovinas. Por meio das análises realizadas, observou-se que as estruturas suplementadas com a proteína apresentaram melhores resultados quanto aos parâmetros analisados, revelando grande potencial para aplicação na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Na primeira análise, utilizou-se o MitoTracker como marcador de atividade mitocondrial. Esse marcador é capaz de atravessar a membrana de células viáveis de forma passiva e reagir com os tióis das proteínas e peptídeos para formar um conjugado fixável em aldeído. Nesse trabalho, a análise foi dividida em duas partes, a primeira avaliou a atividade mitocondrial do CCO como um todo, enquanto a segunda avaliou apenas do ovócito. Como demonstrado na Figura 1A e 1B, houve diferença entre os tratamentos apenas na análise do ovócito. No entanto, na análise do CCO, obteve-se um P de 0,075. Deste modo, acredita-se que há uma tendência à diferença estatística entre os grupos, a qual poderia ser atingida pelo aumento do número de ovócitos analisados.

O resultado obtido é de extrema importância, uma vez que a mitocôndria desempenha dois papéis primordiais na célula, sendo eles a manutenção da célula ou a indução da morte celular. Desta forma, no embrião, a mitocôndria determinará se o mesmo irá se desenvolver ou se será degenerado. A regulação desses processos irá ocorrer por vários mecanismos, como a modulação do Ca^{2+} e sinalização e produção de ATP, EROs e metabólitos intermediários (DUMOLLARD; DUCHEN; CARROLL, 2007). Estudos demonstram que a alta concentração de ATP nos ovócitos, levam ao aumento significativo das taxas de fertilização e blastocistos

(NAGANO; KATAGIRI; TAKAHASHI, 1994; STOJKOVIC *et al.*, 2001). Sabe-se que a formação dos fusos e os movimentos cromossômicos dependem da expressão e atividade de proteínas motoras que utilizam ATP como fonte de energia. Assim sendo, essa molécula é primordial na maturação nuclear e citoplasmática tanto em humanos como em bovinos (DURAN *et al.*, 2011; NAGANO; KATAGIRI; TAKAHASHI, 1994).

Para suprir a demanda de ATP necessária na maturação, a quantidade de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) aumenta de 6.000 para 100.000 (FERREIRA *et al.*, 2009). Contudo, existem hipóteses que apontam outras causas para essa ampliação, como a proposta de que se trata de um mecanismo genético com o intuito de garantir quantidade suficiente de organelas e genomas até a implantação, uma vez que o mtDNA não passa por replicação durante os estágios de clivagem em ovócitos de mamíferos (SHOUBRIDGE; WAI, 2007). Outra hipótese é que a alta quantidade de mtDNA pode atuar na redução do acúmulo de mutações no mtDNA (CREE *et al.*, 2008). Desta forma, uma vez que a atividade mitocondrial influencia no aumento da vida útil da célula e na conversão do ovócito em embrião, o dado obtido corrobora com os resultados apresentados por Arle (2019) de que a suplementação com Beta-NGF pode afetar positivamente a PIVE em bovinos.

Para o estudo da produção de EROs, realizou-se a marcação dos ovócitos com DCF, que é uma sonda não fluorescente que entra nas células por transporte passivo. No interior da célula ele é desesterificado originando o 2'7'-diclorofluoresceína, que é altamente fluorescente após oxidação. As espécies reativas de oxigênio foram avaliadas no CCO e encontradas em maior quantidade nas células sem tratamento. A presença de EROs é importante, pois atua em diversas cascatas de sinalização como segundo mensageiro (FUJII; IUCHI; OKADA, 2005). Contudo, quando em níveis supra-fisiológicos, a célula pode ser afetada pela peroxidação lipídica, que irá romper a membrana celular, pela agregação e degradação de proteínas e danos ao DNA (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991; EVANS; DIZDAROGLU; COOKE, 2004; PARK *et al.*, 2010; RICHTER, 1987).

Como exposto anteriormente, o processo de maturação ovocitária exige alta quantidade de energia na forma de ATP, porém sua produção aumenta a geração de EROs pelas mitocôndrias (CHAPPEL, 2013). Quando a maturação ocorre no fluido folicular, existem antioxidantes enzimáticos que irão oxidar essas EROs em moléculas menos nocivas. Porém, quando em *in vitro*, além de não haver os antioxidantes do fluido folicular, ainda há a exposição a fatores oxidativos. (AMBEKAR *et al.*, 2013). Desta forma, a suplementação com Beta-NGF

indica uma redução da produção de EROs, mesmo em condições favoráveis para sua produção, o que leva a hipótese dessa proteína, possivelmente, possuir uma atividade antioxidante, que proporcionará melhor desenvolvimento das células e conversão em embrião.

Complementando a pesquisa, foi feita a análise da taxa de apoptose e morte celular por meio da coloração com iodeto de propídeo e Yo-Pro-1. A partir do primeiro corante, obteve-se a marcação de células mortas, uma vez que sua membrana perde integridade permitindo a passagem do corante e subsequente ligação ao ácido nucleico. O Yo-Pro-1 também foi utilizado para marcação de ácido nucleico, porém para a análise de células apoptóticas, dado que essas tornam-se permeáveis apenas para o Yo-Pro-1, mas se mantém impermeáveis para o IP. Em ambas colorações, a emissão de fluorescência se mostrou superior no grupo controle, indicando que o grupo com Beta-NGF possui menor taxa de apoptose e morte celular.

Assim como abordado anteriormente, a atividade da mitocôndria influencia diretamente na apoptose e morte celular. Estudos anteriores demonstraram que níveis altos de EROs podem induzir desestabilização da maturação, reduzir os fatores de sobrevivência e induzir a apoptose mediada por mitocôndria nos ovócitos (CHAUBE *et al.*, 2008; PRASAD *et al.*, 2016). Também podem agir por meio de mudanças morfológicas no ovócito e fragmentação do DNA (ZHANG *et al.*, 2006). Desta forma, o dados obtidos quanto ao parâmetro de apoptose e morte celular condizem com o resultado obtido da avaliação da produção de EROs. Assim sendo, a suplementação com Beta-NGF realmente atua no aumento da longevidade devido as possíveis propriedades antioxidantes e diminuição de EROs e apoptose.

6. Conclusão

A suplementação com Beta-NGF atua de forma positiva na produção *in vitro* de embriões, uma vez que é capaz de aumentar a quantidade ou a atividade de mitocôndrias e, conseqüentemente, de ATP, sem que haja aumento de espécies reativa de oxigênio, levando a uma menor taxa de apoptose e morte celular.

7. Referências

AMBEKAR, A. S.; NIRUJOGI, R. S.; SRIKANTH, S. M.; CHAVAN, S.; KELKAR, D. S.; HINDUJA, I.; ZAVERI, K.; PRASAD, T. S. K.; HARSHA, H. C.; PANDEY, A.; MUKHERJEE, S. Proteomic analysis of human follicular fluid: A new perspective towards understanding folliculogenesis. **Journal of Proteomics**, v. 87, p. 68–77, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.017>

ARLE, N. C. S. **Localização de receptores de beta-NGF (P75 e TRK) em células do cúmulo e ovócitos imaturos bovinos e sua estimulação com beta-NGF durante a maturação in vitro**. 2019. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

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

CHAPPEL, S. The Role of Mitochondria from Mature Oocyte to Viable Blastocyst. **Obstetrics and Gynecology International**, v. 2013, p. 1–10, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/183024>

CHAUBE, S. K.; KHATUN, S.; MISRA, S. K.; SHRIVASTAV, T. G. Calcium ionophore-induced egg activation and apoptosis are associated with the generation of intracellular hydrogen peroxide. **Free Radical Research**, v. 42, n. 3, p. 212–220, 2008. <https://doi.org/10.1080/10715760701868352>

CREE, L. M.; SAMUELS, D. C.; CHUVA, S.; LOPES, S.; RAJASIMHA, H. K.; WONNAPINI, P.; MANN, J. R.; DAHL, H.-H. M.; CHINNERY, P. F. A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. **Nature Genetics**, v. 40, n. 2, p. 249–254, 2008. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.63>

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

DURAN, H. E.; SIMSEK-DURAN, F.; OEHNINGER, S. C.; JONES, H. W.; CASTORA, F. J. The association of reproductive senescence with mitochondrial quantity, function, and DNA integrity in human oocytes at different stages of maturation. **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 2, p. 384–388, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.05.056>

EL ALLALI, K.; EL BOUSMAKI, N.; AINANI, H.; SIMONNEAUX, V. Effect of the Camelid's seminal plasma ovulation-inducing factor/ β -NGF: A kisspeptin target hypothesis. **Frontiers in Veterinary Science**. 2017. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00099>

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 11, p. 81–128, 1991. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6)

EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; COOKE, M. S. Oxidative DNA damage and disease: Induction, repair and significance. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 567, p. 1–61, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.11.001>

FAN, H.-Y.; SUN, Q.-Y. Oocyte Meiotic Maturation. *Em: The Ovary*3. Elsevier, 2019. p. 181–203. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813209-8.00012-1>

FERRÉ, L. B.; KJELLAND, M. E.; STRØBECH, L. B.; HYTTEL, P.; MERMILLOD, P.; ROSS, P. J. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. **Animal**, v. 14, n.5, p. 991-1004, 2020. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>

FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. v.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. A. S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836–848, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.10.023>

- FUJII, J.; IUCHI, Y.; OKADA, F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, n. 43, p. 1–10, 2005. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-43>
- GODDARD, M. E.; HAYES, B. J.; MEUWISSEN, T. H. E. Genomic selection in livestock populations. **Genetics Research**, v. 92, n. 5–6, p. 413–421, 2010. <https://doi.org/10.1017/S0016672310000613>
- MAO, L.; LOU, H.; LOU, Y.; WANG, N.; JIN, F. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 28, n. 3, p. 284–299, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.10.016>
- MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S. L. G.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. Produção in vitro (PIV) de embriões bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, p. 58–64, 2016.
- NAGANO, M.; KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, Y. ATP content and maturational/developmental ability of bovine oocytes with various cytoplasmic morphologies. **Zygote**, v. 14, p. 299–304, 1994. <https://doi.org/10.1017/S0967199406003807>
- OLIVEIRA, C. S.; VARELLA, R.; CAROLINA, S.; ROMANO, C.; BIOTÉCNICAS, Q.; REPRODUÇÃO, D.; BOVINOS, E. Biotécnicas da Reprodução em Bovinos. **Embrapa**, v. 1, 2014.
- PAN, B.; LI, J. The art of oocyte meiotic arrest regulation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 17, n. 8, p. 1–12, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0445-8>
- PARK, S.-Y.; YOON, S.-J.; JEONG, Y.-T.; KIM, J.-M.; KIM, J.-Y.; BERNERT, B.; ULLMAN, T.; ITZKOWITZ, S. H.; KIM, J.-H.; HAKOMORI, S.-I. N-glycosylation status of b-haptoglobin in sera of patients with colon cancer, chronic inflammatory diseases and normal subjects. **International Journal of Cancer**, v. 126, p. 142–155, 2010. <https://doi.org/10.1002/ijc.24685>
- PEIXER, P. F.; SANTOS, K. J. G.; SANTOS, A. P. P.; BACKES, C.; SANTOS, J. F. D.; CASTRO, C. da S. In vitro embryo production in cattle. **Espacios**, v. 39, n. 16, p. 2–17, 2018.
- PRASAD, S.; TIWARI, M.; PANDEY, A. N.; SHRIVASTAV, T. G.; CHAUBE, S. K. Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome. **Journal of Biomedical Science**, v. 23, n. 36, p. 1–5, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0253-4>
- RICHTER, C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 44, p. 175–189, 1987. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(87\)90049-1](https://doi.org/10.1016/0009-3084(87)90049-1)
- SHOUBRIDGE, E. A.; WAI, T. Mitochondrial DNA and the Mammalian Oocyte. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 77, p. 87–111, 2007. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(06\)77004-1](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(06)77004-1)
- SILVA, R. **Proteoma nuclear e micro-RNAs de espermatozoides de bovinos férteis e subférteis**. Universidade Federal de Uberlândia, 2018.
- STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After In Vitro Maturation: Correlation

with Morphological Criteria and Developmental Capacity After In Vitro Fertilization and Culture 1. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 904–909, 2001. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>

SUN, B.; YEH, J. Identifying fertilization-ready MII-stage oocytes beyond the microscope: a proposed molecular path forward. **F&S Reviews**, v. 2, n. 4, p. 302–316, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.xfmr.2021.09.001>

VIANA, J. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals Divergent trends for IVD and IVP embryos. **Embryo Technology Newsletter**, v. 38, n. 4, p. 1–15, 2020.

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHAO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Anim. Reprod.**, v. 9, n. 1, p. 12–18, 2012.

VIZONÁ, R. G.; DA COSTA PEREZ, B.; CAMPOLINA DINIZ PEIXOTO, M. G.; MOREIRA VIANA, J. H.; VENTURA, R. V.; VERCESI FILHO, A. E.; DE CARVALHO BALIEIRO, J. C. Genetic analysis of in-vitro embryo production traits in Dairy Gir cattle. **Theriogenology**, v. 148, p. 149–161, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.014>

SALEH W. M. Assessment of different methods of bovine oocyte collection, maturation and In vitro fertilization of abattoir specimens. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 31, n. 1, p. 55–65, 2017. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2017.126711>

ZHANG, X.; WU, X. Q.; LU, S.; GUO, Y. L.; MA, X. Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles. **Cell Research**, v. 16, p. 841–850, 2006. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310095>