

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

MEDICINA VETERINÁRIA

**EFEITO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS DE DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE β -NGF NO MEIO DE MATURAÇÃO OVOCITÁRIA**

UBERLÂNDIA

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

HEITOR PEREIRA MARQUEZ

**EFEITO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS DE DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE β -NGF NO MEIO DE MATURAÇÃO OVOCITÁRIA**

Monografia apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Uberlândia para o
Trabalho de Conclusão de Curso II

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Coorientador: Ms. Muller Carrara Martins

UBERLÂNDIA

2023

HEITOR PEREIRA MARQUEZ

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

M357 Marquez, Heitor Pereira, 1999-
2023 Efeito na produção in vitro de embriões bovinos de diferentes concentrações de Beta-NGF no meio de maturação ovocitária [recurso eletrônico] / Heitor Pereira Marquez. - 2023.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em Medicina Veterinária.

Modo de acesso: Internet.

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. I. Beletti, Marcelo Emílio, 1964-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

CDU: 619

**EFEITO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS DE DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE β -NGF NO MEIO DE MATURAÇÃO OVOCITÁRIA**

Monografia apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Uberlândia, 2 de Fevereiro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Prof. Dra. Ricarda Maria dos Santos

Ms. Kelvin Orlando Espinoza Blandon

Dedico esse trabalho, em especial, aos meus pais, Edilamar e Denilson, que não mediram esforços para me apoiar no que podiam e, certamente, essa etapa sem eles não seria concluída.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me proporcionar a honra de concluir uma graduação e conceder todo suporte necessário para que o fosse feito da melhor forma possível: saúde, uma família abençoada, amigos e colegas parceiros e grandes Professores.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, que me orientou não somente durante a execução do presente trabalho, mas em incontáveis momentos durante a graduação, por quem tenho grande admiração e respeito pelo caráter e profissional que é, além de ter me mostrado o desafiador mundo da Pesquisa.

Agradeço à Luisa Miglio pela paciência em cada ensinamento e orientação durante todo esse tempo, com quem aprendi tudo o que sei dos procedimentos executados em um laboratório de PIVE (Produção *in vitro* de embriões).

Agradeço também ao meu coorientador Muller Carrara, exemplo de profissional e pesquisador, com quem aprendi muito não somente sobre a PIVE, mas sobre a Reprodução Bovina como um todo, e que tive o prazer de acompanhá-lo em algumas oportunidades a campo e, com toda certeza, o tenho como grande referência na Medicina Veterinária.

Agradeço à Prof. Dra. Ricarda Maria dos Santos, que foi minha orientadora de monitoria, grande conselheira durante a graduação e quem me fez admirar ainda mais a Reprodução Animal.

Agradeço a cada um dos demais integrantes e ex-integrantes do grupo do Laboratório de Biologia da Reprodução: Gabriel, Natália, Lucas, com quem tive o privilégio de ter contato e que muito me ajudou com seus conselhos, Matheus, Maria Júlia, que também me apoiou durante os procedimentos no laboratório, Laura, Kamila, Marcela, Mateus, enfim, todos que de alguma forma colaboraram na execução das rotinas.

Agradeço também aos meus grandes amigos e colegas de turma que a UFU me proporcionou conhecer: Guilherme, Gabriel, Matheus, Vitória, Beatriz, Giovanna, Rafaela, Camila, Vitor Hugo, entre tantos. Desejo muito sucesso a cada um de vocês!

Agradeço ao meu tio Genilson, por cada preocupação, apoio, incentivo e orientação, que foram imprescindíveis até aqui e sempre levarei comigo.

Agradeço aos meus avós: Albertina e Nêgo, que do céu me amparam, Ronaldo e

Nira. Resiliência, humildade e ética são palavras que lhes definem e, sem dúvidas, sempre serão meu espelho de conduta.

Por fim, minha imensa e eterna gratidão aos meus pais, Edilamar e Denilson, que são meu esteio, por lembrarem e lembrarem que o que de fato importa são as relações construídas e as responsabilidades que temos para com elas, isso permanece para além dessa vida. Muito obrigado!

RESUMO

Uma das biotécnicas mais utilizadas nos últimos anos, aplicada à reprodução animal, é a produção *in vitro* de embriões (PIVE), biotecnologia que tem desempenhado papel de destaque na evolução da eficiência da bovinocultura. Isso se deve, principalmente, à possibilidade de se aumentar a produção de bezerros por vaca geneticamente superior. Porém, trata-se de uma técnica de alto custo e o aproveitamento de ovócitos é pouco eficiente. Além disso, também foi verificada uma correlação positiva entre a quantidade de Beta-NGF nos espermatozoides e as taxas de clivagem e blastocisto na PIVE, o que indica possível atuação durante o desenvolvimento embrionário inicial. Recentemente verificou-se que a adição de 100 ng/mL no meio de maturação de ovócitos aumenta a eficiência da PIVE em bovinos. Com o presente trabalho objetivou-se avaliar o efeito na produção *in vitro* de embriões bovinos de duas diferentes concentrações de β -NGF no meio de maturação ovocitária. Para isso, foram realizadas PIVEs, nas quais os ovócitos foram obtidos a partir da aspiração folicular, feita em laboratório, de ovários coletados em abatedouro comercial de Araguari- MG. Foi utilizado sêmen congelado de um único touro de central de processamento de sêmen com fertilidade comprovada para produção *in vitro* de embriões. Em todas as rotinas foram utilizadas gotas de meio de maturação sem suplementação proteica e com suplementação de β -NGF nas concentrações de 100 ng/mL e 500 ng/mL. A taxa de clivagem foi avaliada 48 horas após a fecundação *in vitro*, por meio da avaliação das estruturas que apresentavam duas ou mais células. Sete dias após a fecundação, a taxa de desenvolvimento embrionário era avaliada pela contagem de estruturas que iniciavam a clivagem e alcançavam o estágio de blastocisto. A taxa de clivagem foi diferente entre todos os tratamentos, sendo maior com 100 ng/mL e menor com 500 ng/mL. As taxas de desenvolvimento embrionário não apresentaram diferença. Já a eficiência das PIVEs também foi maior com 100 ng/mL e não apresentou diferença entre o controle e 500 ng/mL. Pôde-se concluir que a suplementação do meio de maturação de ovócitos com 100 ng/mL de NGF melhora a maturação ovocitária *in vitro*, melhorando a eficiência da PIVE. Já a suplementação com 500 ng/mL provoca um efeito negativo, provavelmente citotóxico, e conseqüentemente, não é indicada em rotinas de PIVE.

Palavras-chave: PIVE, Beta-NGF, embrião, ovócito, espermatozoide.

ABSTRACT

One of the most used biotechniques in recent years, applied to animal reproduction, is *in vitro* embryo production (IVP), a biotechnology that has played a prominent role in the evolution of cattle breeding efficiency. This is mainly due to the possibility of increasing the production of calves per genetically superior cow. However, it is a high-cost technique and the use of oocytes is inefficient. In addition, a positive correlation was also verified between the amount of Beta-NGF in sperm and cleavage and blastocyst rates in PIVE, which indicates possible action during early embryonic development. Recently, it was verified that the addition of 100 ng/mL in the oocyte maturation medium increases the efficiency of PIVE in cattle. The present work aimed to evaluate the effect on the *in vitro* production of bovine embryos of two different concentrations of β -NGF in the oocyte maturation medium. For this, PIVEs were performed, in which the oocytes were obtained from follicular aspiration, carried out in the laboratory, from ovaries collected in a commercial slaughterhouse in Araguari-MG. Frozen semen from a single bull from a semen processing center with proven fertility was used for *in vitro* embryo production. In all routines, drops of maturation medium were used without protein supplementation and with β -NGF supplementation at concentrations of 100 ng/mL and 500 ng/mL. The cleavage rate was evaluated 48 hours after *in vitro* fertilization, by evaluating the structures that had two or more cells. Seven days after fertilization, the rate of embryonic development was evaluated by counting the structures that initiated cleavage and reached the blastocyst stage. The cleavage rate was different between all treatments, being higher with 100 ng/mL and lower with 500 ng/mL. Embryonic development rates showed no difference. The efficiency of PIVEs was also higher with 100 ng/mL and do not show any difference between the control and 500 ng/mL. It can be concluded that the supplementation of the oocyte maturation medium with 100 ng/mL of NGF improves oocyte maturation *in vitro*, improving the efficiency of PIVE. Supplementation with 500 ng/mL, on the other hand, causes a negative effect, probably cytotoxic, and, consequently, is not indicated in PIVE routines.

Key words: IVEP, Beta-NGF, embryo, oocyte, spermatozoa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1. Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE).....	11
2.2. Beta-NGF.....	12
2.3. Importância da Beta-NGF na reprodução.....	13
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1. Ovócitos e sêmen.....	14
4.2. Maturação <i>in vitro</i>	15
4.3. Fertilização <i>in vitro</i>	16
4.4. Cultivo <i>in vitro</i>	16
4.5. Avaliação estatística.....	17
5. RESULTADOS	18
6. DISCUSSÃO	21
7. CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

A atividade pecuária se configura no Brasil como um dos principais pilares do agronegócio e de suma importância para a economia nacional. Diante disso, produtores e empresas do ramo lançam mão de diversas estratégias a fim de obterem melhores resultados, de modo a garantir o retorno esperado de seus investimentos. Dentre elas, a exploração da capacidade reprodutiva dos bovinos se faz presente por meio de várias biotecnologias, sendo a produção *in vitro* de embriões (PIVE) uma das principais. Essa técnica permite, por exemplo, um grande aumento na produção de bezerras por vaca geneticamente superior e em tempo reduzido, o que contribui para o melhoramento genético e, conseqüentemente, para produção de carne ou leite. Em contrapartida, trata-se de uma biotécnica bastante onerosa, com baixo aproveitamento de ovócitos e, dentre as etapas da PIVE, a de cultivo é a mais desafiadora, devido à baixa taxa de formação de blastocistos a partir dos ovócitos maturados (MELLO et al, 2016).

Em busca de uma maior viabilidade e eficiência da PIVE, algumas pesquisas são desenvolvidas a fim de se aprimorar as etapas do processo, desde a aspiração folicular (OPU – ovum pick-up), passando pela maturação (MIV), fertilização (FIV), cultivo (CIV), até a transferência dos embriões (TE). Estratégias como a seleção de doadoras por meio da contagem de folículos antrais (CFA) (GARCIA et al., 2017), levando em conta as diferentes subespécies *Bos taurus* e *Bos indicus* (SOUZA et al., 2019), também têm sido estudadas com o objetivo de se aperfeiçoar tais técnicas.

Ratto et al. (2019) identificaram diversas proteínas no plasma seminal, produzido por glândulas acessórias ao trato reprodutivo masculino, e constatou-se correlação entre estas e a indução de ovulação. Posteriormente, um componente específico do plasma seminal de mamíferos foi descoberto e nomeado de fator de indução de ovulação (OIF) e que, mais tarde, foi identificado como Beta-NGF. Tratava-se de uma neurotrofina que consistia na subunidade beta do fator de crescimento neuronal, conhecida não só pela ação sobre o desenvolvimento do sistema nervoso, mas também por atuar no eixo hipotálamo-hipófise, de modo a estimular a liberação de hormônio luteinizante (LH) e conseqüente ovulação e formação do corpo lúteo, a partir de sua absorção pelo endométrio (EL ALLALI et al., 2017).

Ainda sobre o beta-NGF, verificou-se que em ovinos, além de ser altamente expresso pelas células do cúmulo mas não pelo ovócito durante a maturação, correlação

positiva entre a adição de tal fator nos meios de maturação e fertilização e as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário inicial *in vitro* (CRISPO et al., 2016). Ademais, a Beta-NGF parece ter grande influência sobre a fertilidade bovina, haja vista que, quando administrada em vacas durante a inseminação, ocorre melhoria na função do corpo lúteo, bem como no desenvolvimento do conceito (STEWART et al., 2018).

Recentemente, o grupo de pesquisa do laboratório de Biologia da Reprodução, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, desenvolveu experimento em que se evidenciou que as condições de maturação *in vitro*, como a composição do meio, temperatura e atmosfera gasosa podem influenciar diretamente no sucesso da PIVE. Verificou-se neste estudo efeitos positivos da suplementação com Beta-NGF no meio de maturação não só sobre as taxas de clivagem, como também sobre as taxas de formação de blastocistos (ARLE, 2019).

Com base nisso, seria interessante avaliar os efeitos da adição de Beta-NGF no meio de maturação durante a PIVE em diferentes concentrações sobre as taxas de clivagem e taxa de formação de blastocistos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

A PIVE é uma biotécnica utilizada na reprodução animal, que consiste no desenvolvimento do zigoto, oriundo da interação entre espermatozoide e ovócito, externamente ao trato reprodutivo da fêmea, dividida em algumas etapas: coleta, rastreamento e seleção de ovócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). (MELLO et al., 2016).

Historicamente, apesar de as pesquisas iniciais relacionadas à manipulação de embriões terem se dado em invertebrados marinhos, nos mamíferos e, mais especificamente, em animais de produção como bovinos, somente na década de 80 foi que houveram os primeiros estudos que envolviam maturação e fertilização *in vitro* nessa espécie, quando, então, nasce o primeiro bezerro produzido a partir da técnica ainda em desenvolvimento (GONÇALVES et al., 2007).

No início da década de 90 a PIVE começou a ser implementada no Brasil, cujos resultados eram limitados principalmente pelo desafio na etapa de cultivo dos embriões,

em que a conversão de ovócitos maturados para o estágio de blastocisto era muito baixa (MELLO et al., 2016). Porém, com o avanço e intensificação da produção de carne e leite, totalizando um rebanho de 218,2 milhões de cabeças em 2020 (IBGE), tal biotécnica tem ocupado relevante espaço no cenário nacional. Segundo Viana et al.(2020) o Brasil foi o segundo maior produtor de embriões *in vitro* em 2019, atrás apenas dos EUA, ambos em sua maioria de raças leiteiras.

2.2 Beta-NGF

Acreditava-se que espécies de ovulação induzida, tais como camelo, lhama, coelho, gato, entre outras, dependessem de um sinal nervoso oriundo do estímulo gerado pela cópula, responsável por induzir a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), seguida do pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) para que então ocorresse a ovulação. Logo, diferentemente das espécies de ovulação espontânea, esse fenômeno não seria cíclico e regular. Porém, estudos recentes têm evidenciado que o evento da ovulação nesses animais é desencadeado por um mecanismo um pouco mais complexo do que apenas um estímulo copulatório. (SILVA. M, et al., 2020)

A proteína Beta-NGF é uma neurotrofina nomeada como fator de crescimento neuronal, que foi identificada em estudos dos componentes do plasma seminal (RATTO et al., 2019), cuja sua influência sobre o eixo hipotálamo-hipófise veio a ser identificada e, por isso, também passou a ser conhecida como fator de indução de ovulação (OIF) em camelídeos.

Neurotrofinas (NTs) consistem em proteínas que promovem a diferenciação e crescimento de neurônios dos sistemas nervoso central e periférico (SNC e SNP) e a NGF é a mais conhecida delas. Apesar de sua função ter sido inicialmente reconhecida tanto em espécies de ovulação induzida como de ovulação espontânea a nível de SNC e SNP, várias pesquisas vieram a investigar seus efeitos extra neuronais, posteriormente. TrkA e p75 são receptores de NGF de alta e baixa afinidade, respectivamente, encontrados em ovários humanos ainda em fase fetal. Ademais, em roedores, essa neurotrofina contribui para um desenvolvimento folicular precoce e consequente ovulação e diferenciação de tecido ovariano. (SILVA. M, et al., 2020).

Os mesmos receptores, TrK e p75, foram identificados por Arle (2019) em células do cúmulo e nos próprios ovócitos imaturos bovinos. Nesse estudo, verificou-se também

a influência positiva da suplementação com NGF de 100ng/mL em meio de maturação ovocitária sobre as taxas de clivagem e formação de blastocistos. Os mesmos efeitos foram notados por Lopes (2022), que, utilizando a mesma concentração proteica, comprovou a atuação da NGF sobre a atividade mitocondrial, como consequência, sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e taxas de morte celular e apoptose, que se mostraram inferiores no grupo suplementado.

Com o objetivo de detectar marcadores moleculares de fertilidade e subfertilidade em touros, Silva (2018) avaliou micro-RNAs e proteínas de espermatozoides de bovinos férteis e inférteis e identificou, dentre várias, a Beta-NGF como um marcador de fertilidade, comprovada pelas elevadas taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário inicial quando utilizada em PIVEs.

2.3 Importância da Beta-NGF na reprodução

Como dito anteriormente, a NGF e seus receptores, como TrkA, descritos em ovários, mais especificamente expressos pelas células da granulosa em folículos pré-antrais e antrais, parecem promover seu desenvolvimento por meio da diferenciação inicial de folículos recém-formados em estruturas responsivas a gonadotrofinas que estimulam a ovulação. Além disso, tal proteína e seus receptores são expressos em folículos antrais e células lúteas de suínos e em corpo lúteo de caprinos. (SILVA. M, et al., 2020)

Silva et al. (2011), a fim de investigar se o efeito do OIF de lhamas sobre a secreção de LH seria mediado pela estimulação do hipotálamo ou da hipófise, fizeram uso de um antagonista de GnRH. Curiosamente, o efeito de liberação de LH mediado pela NGF foi inibido nos animais tratados com o antagonista, que compete pelos receptores de GnRH na adenohipófise, o que sugere que a secreção de LH é modulada por um efeito direto ou indireto do OIF em neurônios liberadores de GnRH no hipotálamo.

Com o objetivo de testar a bioatividade da NGF presente no plasma seminal de bovinos e determinar seus efeitos sobre a ovulação e desenvolvimento do corpo lúteo, Tribulo et al. (2014), em estudo que comparava o plasma seminal de bovinos com de lhamas, verificaram efeitos ovulatórios semelhantes em ambos. Além disso, a administração de plasma seminal culminou em uma maior concentração plasmática de progesterona após 4 horas da ovulação, o que indica um efeito também luteotrófico do

OIF em bovinos.

Gajardo et al. (2021), diante da relação inversa entre o desempenho produtivo e o desempenho reprodutivo de bovinos leiteiros com a evolução genética dos últimos anos, estudaram a influência da Beta-NGF na eficiência de protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). A administração sistêmica da proteína em novilhas durante o pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH), apesar de não influenciar no diâmetro do corpo lúteo, melhora sua vascularização e, conseqüentemente, eleva a concentração plasmática de progesterona (P4), o que parece ser interessante para essa categoria animal considerada um desafio no manejo reprodutivo em grande parte das fazendas.

Dada a relevância dessa proteína para a reprodução como um todo, bem como a necessidade de elucidação de seus mecanismos de ação, torna-se pertinente investigar, também, seus efeitos sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos, objetivo do presente trabalho.

3 OBJETIVOS

Objetivou-se, com o presente trabalho, investigar o efeito na produção *in vitro* de embriões bovinos da adição de 100 ng/mL e 500 ng/mL de β -NGF no meio de maturação ovocitária e sua implicação na conversão de ovócitos até o estágio de blastocistos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ovócitos e sêmen

Foram coletados ovários de vacas abatidas em abatedouro comercial da cidade de Araguari- MG, armazenados em recipientes térmicos com soro fisiológico a 37°C e imediatamente transportados ao Laboratório de Biologia da Reprodução da UFU, onde ficavam mantidos à mesma temperatura de 37°C para aspiração dos folículos.

Os folículos antrais ovarianos eram aspirados utilizando seringas de 10 mL e agulha 18G e o fluido aspirado era transferido lentamente, de modo a evitar atritos e turbilhonamentos, para tubos de 50 mL, onde permanecia por 15 minutos para a sedimentação. O sedimento era depositado em placas de poliestireno de 90 x 15 mm

para posterior rastreio dos ovócitos em microscópio estereoscópio. Os ovócitos a serem selecionados eram os classificados como grau I e II, segundo a classificação de Stojkovic (2001). Os ovócitos com células do cumulus compactas com mais de 3 camadas, ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração escura eram considerados grau I. Já os considerados grau II eram aqueles com células do cumulus parcialmente compactas presente em volta do ovócito ou rodeando-o por completo com menos de 3 camadas, ooplasma heterogêneo com presença de granulações, podendo apresentar coloração mais clara na periferia e citoplasma preenchendo todo o interior da zona pelúcida.

Foi utilizado sêmen congelado em nitrogênio líquido de um único touro de central especializada e com fertilidade comprovada para produção *in vitro*, já utilizado no Laboratório de Biologia de Reprodução Animal da UFU.

4.2 Maturação *in vitro*

Os ovócitos selecionados eram lavados uma vez em meio de lavagem TCM – 199 HEPES (0,2mM piruvato sódico, 10mM HEPES ácido, 10mM de HEPES sódico, 5mM bicarbonato de sódio, 83µg/mL de amicacina, suplementado com 10% de soro fetal bovino) e uma vez em 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). Eram transferidos de 15 a 20 ovócitos por gota de 100µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral em placas de petri de poliestireno de 60 x 15 mm e mantidos por cerca de 22 h em estufa na temperatura de 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂.

Foram escolhidas, aleatoriamente, 2 gotas para o grupo controle, 2 submetidas à suplementação de NGF na concentração de 100 ng/mL, recomendada por Crispo et al. (2016), e outras 2 que foram submetidas à suplementação de NGF na concentração de 500 ng/mL.

4.3 Fertilização *in vitro*

Após maturados, os ovócitos passavam por 3 lavagens em microgotas de 100 µL de meio Talp-fert (suplementado com 0,2 mM piruvato sódico, 20,4 µM penicilamina, 10,2

μM hipotaurina, $1,97 \mu\text{M}$ epinefrina, $10 \mu\text{g/mL}$ heparina, 6 mg/mL BSA e $83 \mu\text{g/mL}$ amicacina), e eram transferidos para gotas de $100 \mu\text{L}$ de meio Talp-fert cobertas com óleo mineral em placas de poliestireno de $60 \times 15 \text{ mm}$. A fim de selecionar os espermatozoides viáveis, uma dose de sêmen era descongelada em banho-maria a 37°C por 30 segundos e depositada sobre um gradiente de Percoll, preparado previamente em um tubo de 15 mL composto por $500 \mu\text{L}$ de Talp-sperm e $500 \mu\text{L}$ da solução de Percoll 90%, formando assim, a camada de Percoll 45% e outra camada, abaixo da primeira, composta por 1 mL da solução de Percoll 90%. Após a deposição do sêmen sobre o gradiente, era feita a centrifugação a $900 \times g$, durante 30 minutos. Realizada a centrifugação, era transferido $30 \mu\text{L}$ do sedimento formado no fundo do tubo, com auxílio de uma micropipeta, para um tubo contendo $30 \mu\text{L}$ de meio Talp-fert (TUBO FIV) para correção da concentração e capacitação dos espermatozoides a serem utilizados na FIV. Cinco microlitros do TUBO FIV foram transferidos para outro tubo com $150 \mu\text{L}$ de meio Talp-fert, a fim de se avaliar a motilidade (TUBO MOTILIDADE), e, $5 \mu\text{L}$ para outro contendo $250 \mu\text{L}$ de água Milli-Q (TUBO CONCENTRAÇÃO), para a determinação da concentração espermática.

A contagem era feita na câmara de Neubauer, preenchendo com 15 a $20 \mu\text{L}$ do conteúdo do TUBO CONCENTRAÇÃO, cada retículo da câmara. Foram contabilizados os espermatozoides contidos em 5 quadrados da câmara de Neubauer para se determinar o volume de meio Talp-sperm que seria adicionado ao TUBO FIV para ajustar a concentração espermática em 100.000 espermatozoides por gota de $100 \mu\text{L}$.

Era feita, então, a adição de $4 \mu\text{L}$ desta mistura em cada gota da placa de FIV, o que resultava em uma concentração de 100×10^3 espermatozoides por gota de FIV e correspondia a 5×10^3 espermatozoides por ovócito.

4.4 Cultivo *in vitro*

Os prováveis zigotos eram desnudados mecanicamente por pipetações sucessivas e lavados por 3 vezes em gotas de $100 \mu\text{L}$ de meio SOF (acrescido de $0,2 \text{ mM}$ piruvato sódico, 5 mg/mL BSA, $2,5\%$ de soro fetal bovino e $83 \mu\text{g/mL}$ amicacina) e então transferidos para gotas de $100 \mu\text{L}$ de meio SOF cobertas com óleo mineral em placas de poliestireno de $60 \times 15 \text{ mm}$, onde eram cultivados por 6 dias.

A taxa de clivagem era avaliada 48 horas após a fecundação *in vitro* por meio da

contagem dos embriões que apresentavam duas ou mais células (taxa de clivagem = n° de estruturas clivadas / n° de ovócitos iniciais). Já a taxa de desenvolvimento embrionário era determinada no sétimo dia após a fecundação, calculada em relação ao número de ovócitos que iniciavam a clivagem e chegavam a este estágio de desenvolvimento (taxa de desenvolvimento embrionário = n° de blastocisto/ n° de embriões utilizados para cálculo da taxa de clivagem). Para avaliação da real eficiência da PIVE, foi utilizado um parâmetro que leva em conta a conversão do ovócito em estágio imaturo até a formação do blastocisto propriamente dito, o que difere da taxa de desenvolvimento embrionário, uma vez que esta foi calculada a partir dos ovócitos que iniciaram o processo de clivagem.

4.5 Avaliação estatística

Foram realizadas 11 rotinas de PIVEs. Como existem diversas variáveis não controladas que influenciam os resultados das PIVEs, foi utilizado um teste estatístico pareado de comparação entre os tratamentos (grupos), isso porque, as variáveis em cada rotina eram as mesmas, com exceção da concentração de NGF no meio de maturação ovocitária. Assim, mesmo que existam diferenças das demais variáveis entre cada rotina de PIVE, esse efeito é neutralizado pela aplicação do teste pareado.

Para a escolha do teste estatístico a ser utilizado, inicialmente foi verificada a distribuição dos dados utilizando-se o teste Komogorov-Smirnov. Como a distribuição dos dados foi caracterizada como “normal”, foi realizado o teste “t” pareado para verificar diferenças entre os grupos.

5 RESULTADOS

As taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário e eficiência das PIVEs estão demonstradas nas figuras 1, 2 e 3, respectivamente.

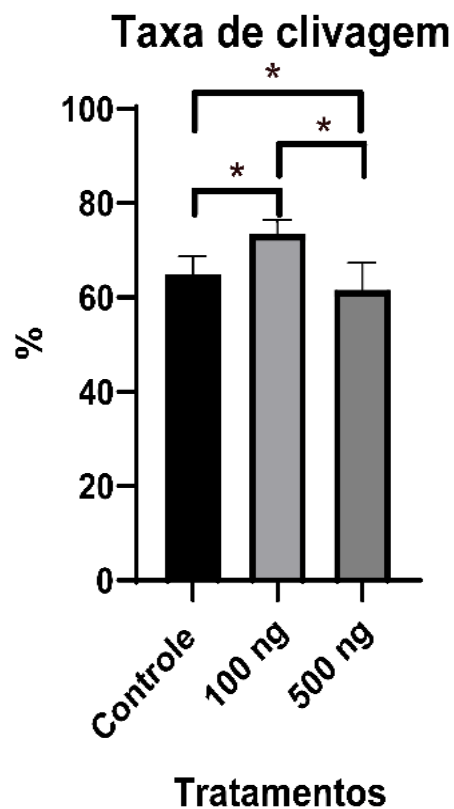


Figura 1: Gráfico demonstrando a média e o erro padrão das taxas de clivagem dos ovócitos do Grupo Controle, Grupo com 100ng de NGF e Grupo com 500ng de NGF em meio de maturação.

Os resultados obtidos e a avaliação estatística mostram que, quanto às taxa de clivagem, houve diferenças entre os três tratamentos, em que os ovócitos suplementados em meio de maturação com 100ng/mL clivaram mais em um período de 48 horas após a FIV do que aqueles sem suplementação e com suplementação de 500ng/mL. Vale ressaltar que a taxa de clivagem no grupo Controle foi superior ao grupo 500ng.

Taxa de desenvolvimento embrionário

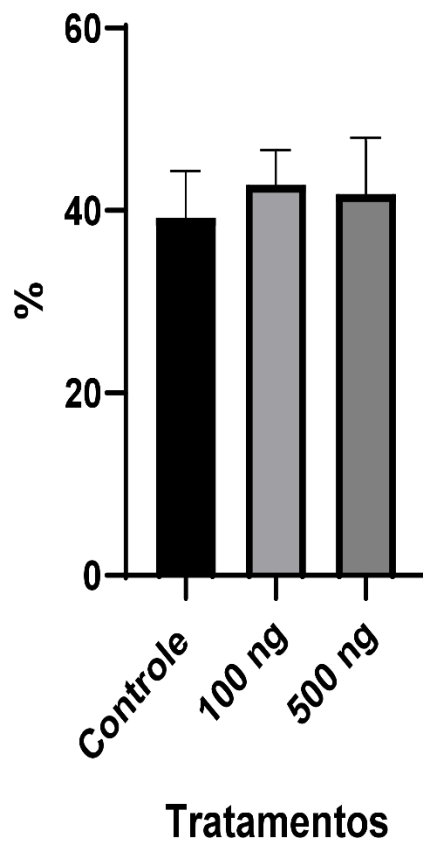


Figura 2: Gráfico demonstrando a média e o erro padrão das taxas de desenvolvimento embrionário dos ovócitos do Grupo Controle, Grupo com 100ng de NGF e Grupo com 500ng de NGF em meio de maturação.

Quanto às taxas de desenvolvimento embrionário, não foi observada diferença entre os tratamentos, porém o grupo 100ng teve taxa numericamente superior que os demais.

Eficiência da PIVE

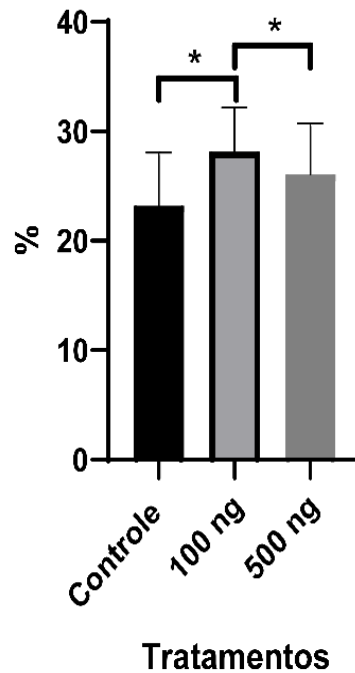


Figura 3: Gráfico demonstrando a média e o erro padrão representativo da Eficiência da PIVE no Grupo Controle, Grupo com 100 ng de NGF e Grupo com 500 ng de NGF no meio de maturação.

Diante da análise da eficiência da PIVE, notou-se diferença entre o grupo com suplementação de 100ng/mL e controle e, também, entre o grupo 100ng e 500ng, ou seja, a técnica se mostrou mais eficiente quando implementada a suplementação de 100ng no meio de maturação, do que quando não suplementada (grupo controle), ou quando implementada na concentração de 500ng/mL.

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a suplementação com Beta-NGF com 100ng/mL melhorou a taxa de clivagem e eficiência da PIVE, mas não a taxa de desenvolvimento embrionário, ao contrário de Arle (2019) que observou melhora tanto na taxa de clivagem como na de blastocisto. Observando a figura 2 percebe-se que o valor numérico da taxa de desenvolvimento embrionário é maior no grupo 100 ng, o que sugere que se o experimento fosse realizado com um número maior de rotinas de PIVE, o resultado poderia ser semelhante ao encontrado por Arle (2019). De qualquer forma, a maior eficiência das PIVEs podem ser explicada pelos resultados obtidos por Lopes (2022) e Arle (2019).

Lopes (2022) avaliou a atividade mitocondrial de ovócitos submetidos à suplementação de 100ng/mL na maturação e percebeu que esta foi superior no tratamento quando comparado ao grupo controle. Além disso, pôde perceber que as células do cúmulo dos ovócitos suplementados apresentavam menos EROs (espécies reativas de oxigênio). No mesmo trabalho, avaliou-se a taxa de apoptose e morte celular por meio da adição de corantes marcadores específicos de ácidos nucleicos de células mortas e células em apoptose, em que se evidenciou, também, o efeito positivo da suplementação com Beta-NGF sobre estes parâmetros.

Um importante fator que pode interferir no sucesso da PIVE e mais especificamente na maturação ovocitária são as células do cúmulo, responsáveis pela produção de ácido hialurônico, que protege a zona pelúcida e está relacionado com processos de capacitação espermática. Além disso, junções comunicantes entre estas e o ovócito, que formam o complexo cúmulo-ovócito, são imprescindíveis para passagens de nutrientes e proteínas reguladoras da maturação (BUENO, BELTRAN, 2008). Sabe-se que a presença de mitocôndrias também influenciam neste evento, uma vez que são responsáveis pela produção de adenosina trifosfato (ATP) e regulação de cálcio intracitoplasmático, além de estarem envolvidas no processo de apoptose (DUMOLLARD et al., 2007).

Apesar da grande importância das mitocôndrias para execução de atividades citoplasmáticas que exigem energia, a geração de ATP leva a um aumento de EROs, que podem causar degradações lipídicas de membranas e interferem na viabilidade celular. Torna-se importante ressaltar que durante a maturação ovocitária, devido à

grande exigência energética, uma grande quantidade de EROs é gerada, porém, *in vivo*, o contato do complexo cúmulo-ovócito com o líquido folicular, rico em substâncias antioxidantes, impede o efeito deletério dessas espécies sobre a viabilidade ovocitária, o que não ocorre na PIVE, uma vez que esse contato é impedido pela aspiração antes mesmo da completa maturação (CHAPPEL,2013; AMBEKAR et al.,2013).

Arle (2019) comprovou a presença dos receptores Trk e p75 em ovócitos bovinos imaturos e suas células do cúmulo e evidenciou o efeito positivo da suplementação de 100 ng/mL de Beta-NGF em meio de maturação ovocitária na PIVE, o que levou a melhores taxas de clivagens e formação de blastocistos. A partir disso, pôde-se perceber que o efeito benéfico de tal proteína não se limita à maturação, pois permanece durante o desenvolvimento embrionário inicial, uma vez que contribui também para formação de blastocistos. Logo, a Beta-NGF parece melhorar de fato a qualidade dos ovócitos.

Assim, os resultados de Lopes (2022) corroboram a ideia de que, além dos benefícios relacionados à maior atividade mitocondrial, bem como a menores taxas de morte celular e apoptose, tais efeitos estão relacionados com a possível ação antioxidante da Beta-NGF durante a maturação ovocitária, dada a menor produção de EROs nas células suplementadas. Contudo, esperava-se que a adição de uma concentração maior desta proteína no meio de maturação maximizaria esses impactos positivos, o que evidentemente não foi observado na avaliação dos dados obtidos no presente estudo.

O TrkA é um receptor de alta afinidade e p75 de baixa afinidade (SILVA. M, et al., 2020). Apesar de pouco elucidadas as reações específicas desencadeadas pela ativação do receptor p75, sabe-se que este induz apoptose. Já o TrkA é um receptor de tirosina quinase, específico de NGF, que quando ativado desencadeia uma cascata de reações que culminam na liberação de cálcio intracitoplasmático e inibem mecanismos apoptóticos. Porém, quando ambos são ativados, o que provavelmente ocorreu nos ovócitos do experimento de Arle (2019), o estímulo gerado por TrkA é potencializado. (BIBEL et al., 1999).

A taxa de clivagem, apesar de não possuir uma relação absoluta com a fertilização, frequentemente é utilizada para indicar a capacidade fecundante *in vitro* de amostras de sêmen. No presente trabalho, apesar de não observada diferença entre os tratamentos quanto à taxa de formação de blastocistos, verificou-se, também, maiores taxas de clivagem com a suplementação de 100 ng/mL, o que pode indicar que a

clivagem está associado não apenas à fecundação ou não fecundação dos ovócitos, mas muito provavelmente também é influenciada pelas condições da maturação celular. Já a taxa de desenvolvimento embrionário, como calculada no presente trabalho, indicaria como o fator testado influenciaria o desenvolvimento embrionário inicial.

No Grupo de 500 ng a taxa de clivagem foi inferior ao Grupo 100 ng e ao Controle e a eficiência da PIVE foi semelhante ao Grupo Controle e inferior ao Grupo 100 ng. Diante dos fatos, pode-se especular duas hipóteses. A primeira e mais provável é que com o aumento da quantidade de Beta-NGF no meio, houve uma maior ligação no receptor de baixa afinidade (p75) ampliando seu efeito negativo, sobrepondo o efeito positivo do TrKA. A segunda hipótese e menos provável é que a concentração de Beta-NGF pode influenciar na proporção de receptores de neurotrofinas no ovócito e/ou células do cúmulo, de modo que concentrações mais elevadas de tal proteína impulsionam a expressão de receptores p75 em detrimento dos TrKA. Em ambas hipóteses ocorreria um possível efeito citotóxico, ampliando a apoptose, o que explicaria a taxa de clivagem no Grupo 500 ng inferior ao Grupo Controle.

7 CONCLUSÃO

A suplementação do meio de maturação de ovócitos com 100 ng/mL de NGF melhora a maturação ovocitária *in vitro*, melhorando a eficiência da PIVE. Já a suplementação com 500 ng/mL provoca um efeito negativo, provavelmente citotóxico, e conseqüentemente, não é indicada em rotinas de PIVE.

REFERÊNCIAS

AMBEKAR, A.S.; NIRUJOGI, R.S.; SRIKANTH, S.M; CHAVAN, S.; KELKAR, D. S.; HINDUJA, I.; ZAVERI, K.; PRASAD, T.S.K.; HARSHAH.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**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade de Biomedicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

BIBEL, M. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. **The Embo Journal**, v. 18, n. 3, p.616-622, 1999. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/18.3.616>

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, artigo:183024, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/183024>

CRISPO, M.; DOS SANTOS-NETO, P.C.; VILARIÑO, M.; MULET, A.P.; DE LEÓN, A.; BARBEITO, L.; MENCHACA, A. Nerve growth factor influences cleavage rate and embryo development in sheep. **Journal of animal science**, v.94, n.10, p. 4447-4451, 2016 <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0736>

DUMOLLARD, R.; DUNCHEN, M; CARROLL, J. The Role of Mitochondrial Function in the Oocyte and Embryo. **Current Topics in Developmental Biology**, v.77, p.21-49, 2017. [http://dx.doi.org/10.1016/S0070-2153\(06\)77002-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0070-2153(06)77002-8)

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**, v. 4, art. 99, 2017. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00099>

GAJARDO, G. et al. Heterologous beta-nerve growth factor (β -NGF) given at the LH surge enhances luteal function in dairy heifers. **Domestic Animal Endocrinology** **77 (2021) 106645** <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2021.106645>

GARCIA, S. et al. Avaliação da taxa de blastocisto e prenhez de embriões produzidos in vitro em decorrência da contagem de folículos antrais em vacas da raça Girolando. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, Parana, v. 15, p. 67-67, 2017. Trabalho apresentado no XII Congresso Brasileiro de Buiatria, Parana, 2017. <https://doi.org/10.7213/cienciaanimal.v15iSuppl%202.16914>

GONÇALVES, Paulo Bayard et al. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.212-217, abr./jun. 2007. <https://doi.org/10.5747/ca.2017>

LOPES. M. J. A. **Efeito da suplementação de beta-NGF no meio de maturação ovocitária in vitro sobre a estrutura citoplasmática do ovócito bovino.** Monografia apresentada à Coordenação do curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Uberlândia, 2022.

MELLO, R.R.C; FERREIRA J.E.; SOUSA S.L.G.; MELLO M.R.B.; PALHANO, H.B. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 2, p. 58–64 , 2016. Disponível em: [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v40/n2/p58-64 \(RB602\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v40/n2/p58-64 (RB602).pdf).

RATTO, M.H.; LEDUC, Y. A.,.; VALDERRAMA, X. P.; VAN STRAATEN, K. E.; DELBAERE, L. T.; PIERSON. R. A.; ADAMS, G. P. The nerve of ovulation-inducing factorin semen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.109, n.37, p. 15042- 15047, 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206273109>

REN, L.; MEDAN, M.S.; WENG, Q.; JIN, W.; LI, C.; WATANABE, G.; TAYA, K. Immunolocalization of nerve growth factor (NGF) and its receptors (TrkA and p75LNGFR) in the reproductive organs of Shiba goats. **The Journal of reproduction and development**, v.51, n3, p. 399-404. doi: <https://doi.org/10.1262/jrd.16082>

SILVA, M. et al. Ovulation mechanism in South American Camelids: The active role of b-NGF as the chemical signal eliciting ovulation in llamas and alpacas. **Theriogenology** 150 (2020) 280e287 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.078>

SILVA, M et al. Cetrorelix suppresses the preovulatory LH surge and ovulation induced by ovulation-inducing factor (OIF) present in llama seminal plasma. **Reproductive biology and endocrinology**, v.9, artigo 74. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-74>

SILVA, R. T. **Proteoma nuclear e micro-RNAs de espermatozoides de bovinos férteis e subférteis**. 2018. 79 f. Tese (Doutorado) -Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal dE Uberlândia, Uberlândia/mg, 2018.

SOUZA, A.C.C et al. Influência da contagem de folículos antrais na produção *in vitro* de embriões bovinos de doadoras Bos indicus e Bos taurus – Revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.43, n.1, p.13-17, jan./mar. 2019.

STEWART, J. L.; MERCADANTE, V. R. G.; DIAS, N. W., CANISSO, I. F.; YAU, P.; IMAI, B.; LIMA, F. S. Nerve Growth Factor-Beta, purified from bull seminal plasma, enhances corpusluteum formation and conceptus development in Bos taurus cows. **Theriogenology**, v. 106, p. 30–38 , 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.007>

TRIBULO, P. et al. Bioactivity of ovulation inducing factor (or nerve growth factor) in bovine seminal plasma and its effects on ovarian function in cattle. **Theriogenology** 83 (2015) 1394–1401 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.014>

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