

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE
MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OVÓCITOS BOVINOS COM
beta-NGF**

Muller Carrara Martins

Médico Veterinário

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

Abril de 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE
MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OVÓCITOS BOVINOS COM
beta-NGF**

Muller Carrara Martins

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Medicina Veterinária –
UFU, como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor em
Ciências Veterinárias
Área de Concentração:
Biotecnologias e eficiência produtiva

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

Abril de 2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M386a Martins, Muller Carrara, 1987
2023 Avaliação da suplementação do meio de maturação in vitro de
ovócitos bovinos com beta-NGF [recurso eletrônico] / Muller Carrara
Martins. - 2023.

Orientador: Marcelo Emilio Beletti.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2023.7048>

Inclui bibliografia.

1. Veterinária. I. Beletti, Marcelo Emilio, 1964-, (Orient.). II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

Glória Aparecida
Bibliotecária Documentalista - CRB-6/2047

**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@ufu.br**ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO**

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	TESE DE DOUTORADO PPGCVET Nº 05/2023				
Data:	26 DE ABRIL DE 2023	Hora de início:	09:00	Hora de encerramento:	11:50
Matrícula do Discente:	11913VET009				
Nome do Discente:	MULLER CARRARA MARTINS				
Título do Trabalho:	Avaliação da suplementação do meio de maturação <i>in vitro</i> de ovócitos bovinos com beta-NGF				
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 por videoconferência a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Ricarda Maria dos Santos (FAMEV/UFU); Renata Lançoni (FAMEV/UFU); Pedro Levy Piza Fontes (Texas A&M University); Amanda Nonato (Laboratório IntelliGen Technologies); Marcelo Emilio Beletti (ICBIM/UFU), orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Marcelo Emilio Beletti, 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(as) 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.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

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 **Marcelo Emilio Beletti, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/04/2023, às 11:53, 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 **Renata Lançoni, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/04/2023, às 11:55, 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 **Ricarda Maria dos Santos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/04/2023, às 11:57, 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 **Amanda Nonato, Usuário Externo**, em 03/05/2023, às 15:49, 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 **Pedro L. P. Fontes, Usuário Externo**, em 05/05/2023, às 07:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4398751** e o código CRC **BF40D82E**.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MULLER CARRARA MARTINS - nascido na cidade de Araporã, estado de Minas Gerais aos vinte e oito dias de outubro de um mil novecentos e oitenta e sete. Ingressou na faculdade de Medicina Veterinária no ano de 2008 concluindo o curso no segundo semestre de 2013 na Universidade Federal de Uberlândia. Trabalhou em propriedades rurais dos estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro e Bahia, com consultoria e assistência veterinária principalmente na área de reprodução animal. Em 2016 se tornou especialista em gestão do agronegócio pela Universidade Católica Dom Bosco- Brasil. Em 2017 foi aprovado no processo seletivo de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (Mestrado) da UFU para ingresso em março de 2017 e conclusão no primeiro semestre de 2019. Professor universitário desde 2018 em faculdades do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. Atualmente proprietário da Empresa MCM Biotecnologia da Reprodução, atuando com assistência reprodutiva em fazendas no Brasil. E acadêmico do curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, com ênfase em Biotecnologias e Eficiência Reprodutiva desde março de 2019.

*“A vontade de se preparar tem que ser
maior que a vontade de vencer.
Vencer será consequência da boa preparação!”
Bernardino.*

*Aos meus avos Abadio, Dalva, Juvenil
e Madalena, e a todos familiares e amigos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente àquele que guia meus passos, me abençoa, e me deu a graça de viver, Deus.

Agradeço aos meus pais, Iridon e Nalva por todo o apoio, dedicação, amor e carinho nesta longa jornada até aqui.

Agradeço aos meus irmãos Murilo e Matheus por todo o carinho e respeito.

Aos colegas do laboratório de Biologia da reprodução, pela ajuda e dedicação. Em especial aos grandes amigos Lucas, Nathália, Heitor, Maria Júlia e Luisa. Sem vocês nada disso teria acontecido, serei eternamente grato.

Aos amigos da 67ª turma, e demais amigos da medicina veterinária.

Aos componentes da banca, por se disporem de seu tempo, e por contribuírem com suas experiências.

Agradeço meu orientador, Marcelo Emílio Beletti. Idealizador dessa pesquisa, sem suas ideias, dedicação, ensinamentos e paciência nada disso seria possível. Não tenho palavras para descrever a admiração e respeito que tenho pelo senhor, esses treze anos de convivência transformaram minha vida profissional, sou infinitamente grato por ter a oportunidade de conviver com você.

Enfim a todos que participaram direta ou indiretamente de minha vida e que contribuíram de algum modo para meu crescimento.

Obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
REFERÊNCIAS.....	11
CAPÍTULO 2 - 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 <i>IN VITRO</i>	17
RESUMO.....	17
ABSTRACT	18
2.1 INTRODUÇÃO.....	19
2.2 OBJETIVOS.....	21
2.2.1 Objetivo geral	21
2.2.2 Objetivos específicos.....	21
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	21
2.3.1 Suplementação com Beta-NGF durante a maturação.....	21
2.3.1.1 Dinâmica da produção <i>in vitro</i> de embriões	21
2.3.1.2 Ovócitos e sêmen.....	22
2.3.1.3 Fixação dos ovócitos imaturos	23
2.3.1.4 Maturação <i>in vitro</i> dos ovócitos	23
2.3.1.5 Fertilização <i>in vitro</i>	25
2.3.1.6 Cultivo <i>in vitro</i>	26
2.3.1.7 Análise estatística das FIVs	27
2.3.2 Imunofluorescência para identificação dos receptores p75 e Trk.....	27
2.4 RESULTADOS	28
2.4.1 Suplementação com Beta-NGF no meio de maturação <i>in vitro</i> favorece as taxas de clivagem e blastocistos.....	28
2.4.2 Ovócitos imaturos e células do cúmulo expressam ambos os receptores de Beta-NGF (p75 e Trk).....	29

2.5 DISCUSSÃO	31
2.6 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	35
CAPÍTULO 3 - EFEITO NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE B-NGF NO MEIO DE MATURAÇÃO OVOCITÁRIA	41
RESUMO	41
ABSTRACT	42
3.1 INTRODUÇÃO	43
3.2 OBJETIVOS	44
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.3.1. Ovócitos e sêmen	44
3.3.2 Maturação <i>in vitro</i>	45
3.3.3 Fertilização <i>in vitro</i>	46
3.3.4 Cultivo <i>in vitro</i>	47
3.3.5 Avaliação estatística	47
3.4 RESULTADOS	48
3.5 DISCUSSÃO	50
3.6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	53
CAPÍTULO 4 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE BETA-NGF NO MEIO DE MATURAÇÃO OVOCITÁRIA <i>IN VITRO</i> SOBRE A ESTRUTURA CITOPLASMÁTICA DO OVÓCITO BOVINO	57
RESUMO	57
ABSTRACT	58
4.1 INTRODUÇÃO	59
4.2 OBJETIVO	61
4.2.1 Objetivo Geral	61
4.2.2 Objetivo específico	62
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS	62
4.3.1 Maturação <i>in vitro</i>	62
4.3.1.1 Suplementação com Beta-NGF	62

4.3.1.2 Obtenção e seleção de CCOs.....	62
4.3.1.3 Maturação <i>in vitro</i> dos ovócitos.....	63
4.3.1.4 Microscopia confocal.....	63
4.3.1.5 Mitocôndrias.....	64
4.3.1.6 Espécies reativas de oxigênio.....	64
4.3.1.7 Apoptose e morte celular.....	65
4.3.1.8 Quantificação da fluorescência.....	65
4.3.1.9 Estatística.....	65
4.4 RESULTADOS.....	66
4.4.1 Microscopia Confocal.....	66
4.4.2 Mitocôndrias.....	67
4.4.3 Espécies Reativas de Oxigênio.....	68
4.4.4 Apoptose e morte celular.....	68
4.5 DISCUSSÃO.....	69
4.6 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS.....	72
CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	adenosina trifosfato
Beta-NGF	Beta-nerve growth factor
CC	células do cúmulo
CIV	cultivo <i>in vitro</i>
COC	Complexos cúmulo ovócito
DAG	diacilglicerol
DCF	diclorofluoresceína
EGF	fator de crescimento
EROs	espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FIV	fertilização <i>in vitro</i>
FSH	hormônio folículo estimulante
GAP	junções comunicantes
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IP3	inositol trifosfato
LH	hormônio luteinizante
mtDNA	DNA mitocondrial
MIV	maturação <i>in vitro</i>
OIF	indução de ovulação
OPU	Eficiência da aspiração folicular
SEMBRA	central de processamento de sêmen
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PLC γ	fosfolipase do tipo γ
TE	transferência de embriões
TrkA	receptores de membrana plasmática de alta
ZP	zona pelúcida
TZP	projeções transzonais

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 - 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*

Figura 1 - Ovócitos utilizados nas PIVEs, classificados como grau I (A e B) e grau II (C e D) segundo Stojkovic (2001).....	23
Figura 2 - Ovócitos maturados, após serem mantidos por 22h em meio de maturação.....	25
Figura 3 - A: embriões clivados no dia 2 (seta); B: blastocistos expandidos e eclodidos no dia 7 (seta).....	27
Figura 4 - Ovócito imaturo e células do cúmulo. Marcação de receptores p75 (A), marcação de núcleos com Yo-Pro-1 Iodide (B) e sobreposição de ambos (C).....	30
Figura 5 - Células do cúmulo de ovócito imaturo. Marcação de receptores p75 (A), marcação de núcleos com Yo-Pro-1 Iodide (B) e sobreposição de ambos (C).	30
Figura 6 - Ovócito imaturo e células do cúmulo. Marcação de receptores Trk (A), marcação de núcleos com Yo-Pro-1 Iodide (B) e sobreposição de ambos (C).....	31
Figura 7 - Células do cúmulo de ovócito imaturo. Marcação de receptores Trk (A), marcação de núcleos com Yo-Pro-1 Iodide (B) e sobreposição de ambos (C)	31
Figura 8 - Representação ilustrativa das projeções transzonais (TZP) entre ovócito e células da granulosa (cúmulo) e suas respectivas junções GAP e aderentes.....	33

CAPÍTULO 3 - EFEITO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE B-NGF NO MEIO DE MATURAÇÃO OVOCITÁRIA

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.....	48
--	----

Figura 2 - Gráfico demonstrando a média e o erro padrão das taxas de blastocisto dos ovócitos do Grupo Controle, Grupo com 100ng de NGF e Grupo com 500ng de NGF em meio de maturação.....	49
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.....	50

CAPÍTULO 4 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE BETA-NGF NO MEIO DE MATURAÇÃO OVOCITÁRIA IN VITRO SOBRE A ESTRUTURA CITOPLASMÁTICA DO OVÓCITO BOVINO.

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.....	66
Figura 2 - Ovócitos marcados com Mitotracker com sobreposição de "slices" (2A) sem e (2B) com suplementação.....	67
Figura 3 - CCOs marcados com Mitotracker com sobreposição de "slices" (3A) sem suplementação e (3B) com suplementação.....	67
Figura 4 - CCOs marcados com DCF com sobreposição de "slices" (4A) sem e (4B) com suplementação.....	68
Figura 5 - CCOs marcados com iodeto de propídeo com sobreposição de "slices" (5A) sem e (5B) com suplementação.....	69
Figura 6 - CCOs marcados com Yo-Pro-1 com sobreposição de "slices" (6A) sem e (6B) com suplementação.....	69

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - 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*

- Tabela 1** - Dinâmica da produção *in vitro* de embriões bovinos, onde todo dia 0 é onde ocorre a fertilização *in vitro* (FIV)..... 22
- Tabela 2** - Número de ovócitos imaturos, embriões clivados e blastocistos, nos grupos suplementado (S) e controle (C), em cada uma das rotinas..... 29
- Tabela 3** - Taxas de clivagem e de blastocistos obtidas em cada rotina de PIVE com meio suplementado com Beta-NGF e não suplementado e valor de *p* obtido na comparação dos grupos utilizando-se o teste T pareado..... 29

CAPÍTULO 4 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE BETA-NGF NO MEIO DE MATURAÇÃO OVOCITÁRIA *IN VITRO* SOBRE A ESTRUTURA CITOPLASMÁTICA DO OVÓCITO BOVINO.

- Tabela 1** - Média dos valores de emissão de fluorescência de cada marcador no grupo sem suplementação (controle) e com suplementação (Beta-NGF)..... 66

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) já é uma técnica muito utilizada e comprovadamente viável, porém, pode ser melhorada. Foi verificada uma correlação positiva entre a quantidade de Beta-NGF nos espermatozoides e as taxas de clivagem e de blastocisto na produção *in vitro* de embriões, assim este é o primeiro trabalho que avalia a suplementação de Beta-NGF nos meios de PIVE, tendo como objetivo identificar os receptores de Beta-NGF (p75 e Trk), verificar o efeito na produção de embriões, identificar qual a melhor concentração e avaliar a qualidade das estruturas suplementadas. Complexos cúmulo ovócito (COC) foram marcados por imunofluorescência indireta para receptores p75 e Trk e avaliados em microscopia confocal e foram realizadas rotinas de PIVEs. Ambos os receptores foram localizados nos ovócitos e nas células do cúmulo. As PIVEs suplementadas tiveram melhores taxas de clivagem e de formação de blastocistos (teste t pareado, $p < 0,05$). Para avaliar a estrutura citoplasmática dos ovócitos maturados *in vitro*, dividiu-se em dois grupos, com e sem suplementação de beta-NGF. Optou-se pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$), para verificar se existia diferença entre os dois tratamentos. Os resultados mostraram que a suplementação induziu o aumento na quantidade de mitocôndrias ($p \leq 0,0424$), além de reduzir a produção de EROs ($p \leq 0,0001$), e conseqüentemente da apoptose e morte celular ($p \leq 0,0027$). Para a avaliação da melhor concentração, o experimento foi dividido em três grupos: controle, suplementação com 100ng/ml e 500 ng/ml, aplicando teste t pareado, ($p < 0,05$). com a suplementação da proteína no meio de maturação. A taxa de clivagem se mostrou melhor no grupo 100 ng/ml, já a produção de blastocisto não apresentou diferença. Assim, podemos afirmar que a suplementação com a Beta-NGF pode ser uma boa alternativa para melhorar o desempenho da PIVE.

Palavras-chave: PIVE, p75, Trk, proteína seminal, maturação.

ABSTRACT

The in vitro embryo production (IVP) is already a widely used and proven viable technique, however, it can be improved. A positive relationship was verified between the amount of Beta-NGF in sperm and cleavage and blastocyst rates in in vitro embryo production, so this is the first work that evaluates Beta-NGF supplementation in IVP media, aiming to identify Beta-NGF receptors (p75 and Trk), verify the effect on embryo production, identify the best concentration and evaluate the quality of the supplemented structures. Cumulus oocyte complexes (COC) were stained by indirect immunofluorescence for p75 and Trk receptors and evaluated by confocal microscopy and routine PIVEs were performed. Both receptors were localized to oocytes and cumulus cells. Supplemented PIVEs had better rates of cleavage and blastocyst formation (paired t-test, $p < 0.05$). To evaluate the cytoplasmic structure of in vitro matured oocytes, it was divided into two groups, with and without beta-NGF supplementation. Student's t test ($p \leq 0.05$) was chosen to verify whether there was a difference between the two treatments. The results showed that supplementation induced an increase in the amount of mitochondria ($p \leq 0.0424$), in addition to reducing the production of ROS ($p \leq 0.0001$), and consequently apoptosis and cell death ($p \leq 0.0027$). For the evaluation of the best concentration, the experiment was divided into three groups: control, supplementation with 100ng/ml and 500ng/ml, applying paired t test, $p < 0.05$. with protein supplementation in the improvement medium. cleavage was better in the 100 ng/ml group, blastocyst production showed no difference. Thus, we can say that supplementation with Beta-NGF can be a good alternative to improve IVP performance.

Keywords: IVP, p75, Trk, seminal protein, maturation.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

No ano de 2022 o Brasil posicionou-se como detentor do maior rebanho bovino, o segundo maior consumidor e o segundo maior exportador de carne bovina do mundo (ABIEC, 2022). Como modo de aumentar a eficiência da bovinocultura, utiliza-se de biotecnologias, principalmente para a reprodução desses animais. Dentre essas biotécnicas, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem tido um papel importante nesse processo, ao possibilitar a produção de um número maior de embriões por vaca de alto potencial genético em um menor período. Entretanto, o processo de PIVE é extremamente custoso e o cultivo *in vitro* é sua etapa menos eficiente, sendo que em média apenas 30% dos ovócitos maturados chegam ao estado de blastocistos (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 que ocorreu 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. Porém, com o avanço e intensificação da produção de carne e leite, totalizando um rebanho de 218,2 milhões de cabeças em 2020, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (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 Estados Unidos da América (EUA), ambos em sua maioria de raças leiteiras.

Pesquisas buscam estratégias que barateiem e aumentem a eficiência da aspiração folicular (OPU) e da produção *in vitro* de embriões (PIVE) (SANTOS *et al.*, 2017), aperfeiçoando a coleta de ovócitos, maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV), cultivo *in vitro* (CIV) e transferência de embriões (TE) (GARCIA *et al.*, 2017), dando ênfase na função, desenvolvimento e metabolismo de gametas e

embriões, utilização da ultrassonografia, desenvolvimento de fármacos seguros e efetivos e desenvolvimento de meios de cultivo, considerados como fator limitantes do sucesso da técnica (SANTOS *et al.*, 2017).

Assim diversas pesquisas são realizadas diariamente, e sem dúvida a composição dos meios de produção de embriões são determinantes para o sucesso do processo. A suplementação com substâncias que possam melhorar a qualidade do meio se faz necessária diante da cobrança por melhores resultados, a beta subunidade do fator de crescimento do nervo ou “Beta-nerve growth factor” (Beta-NGF) é uma proteína que vem sendo pesquisada por conta das suas características associadas a reprodução animal, assim o nosso estudo visa avaliar a sua utilização e o seu mecanismo de ação quando suplementada no meio de maturação *in vitro* de embriões bovinos (PIVEs).

Recentemente, um grupo desenvolveu pesquisa (SILVA, 2018) que identificou dezenas de proteínas do espermatozoide bovino que possuem correlação altamente positiva ou negativa com a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial *in vitro*. As principais proteínas com correlação positiva com a fertilização foram: “Beta-nerve growth factor” (Beta-NGF)($r=0,99$), “Lingual antimicrobial peptide” ($r=0,98$), “Calicin” ($r=0,97$) e “Acyl-protein thioesterase 1” (APT-1)($r=0,95$). As principais proteínas com correlação positiva com o desenvolvimento embrionário inicial foram: “Protein FAM71D” ($r=0,99$), “60S ribosomal protein L9” ($r=0,99$), “Signal peptidase complex subunit 3” ($r=0,99$), “Serine racemase” ($r=0,99$), “Spermatogenesis-associated protein 6” ($r=0,99$), “40S ribosomal protein S8” ($r=0,98$), “cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alfa” (PKA C- α)($r=0,98$), “T-complex protein 1 subunit gamma” (TCP-1- γ)(CCT- γ)($r=0,98$), “Acyl-protein thioesterase 1” (APT-1) ($r=0,97$) e “Beta-nerve growth factor” (Beta-NGF)($r=0,96$).

É interessante salientar que as proteínas “beta-nerve growth factor” (Beta-NGF) e “Acyl-protein thioesterase 1” possuem alta correlação tanto com o processo de fertilização como com o desenvolvimento embrionário inicial e portanto devem ter grande importância no sucesso da PIVE em bovinos.

Outros estudos identificaram e purificaram um componente bioquímico do plasma seminal de mamíferos que estimula a ovulação, nomeando-o assim de fator de indução de ovulação (OIF). Mais tarde, foi descoberto se tratar de uma

neurotrofina, a beta subunidade do fator de crescimento do nervo ou “Beta-nerve growth factor” (Beta-NGF), que promove a sobrevivência e o crescimento neuronal, além de poder estar relacionada com fatores endócrinos ao ser absorvida através do endométrio e chegar ao sistema nervoso central onde influenciaria a liberação do hormônio luteinizante, desencadeando a ovulação e o desenvolvimento do corpo lúteo (EL ALLALI *et al.*, 2017). Sabe-se que a proteína Beta-NGF, quando administrada para fêmeas durante a inseminação, também melhora a função do corpo lúteo, podendo indicar que essa proteína melhoraria a fertilidade em bovinos (FENG *et al.*, 2018). Novos estudos são requeridos para determinar se a proteína Beta-NGF diminuiria a perda embrionária inicial (STEWART *et al.*, 2018).

RATTO *et al.* (2019) sugere que a Beta NGF pode estar associada com a ovulação em animais de ovulação induzida, tais como camelo, lhama, coelho, gato, entre outras, pois dependem 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 *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.

Existem diversas metodologias para se estudar a importância de uma proteína em algum processo biológico. Dentre elas está a utilização de diminuição da expressão gênica desta proteína pela transfecção de siRNAs específicos (ABEL; REDERSTORFF, 2015). Também é possível aumentar o nível da proteína utilizando metodologia similar (NAKAJIMA; YAOITA, 2015). Assim, pode-se verificar qual o efeito da diminuição e aumento de uma proteína em um sistema biológico a ser estudado, como por exemplo, o desenvolvimento embrionário inicial. Sendo a Beta-

NGF a mais promissora das proteínas espermáticas que poderiam ser utilizadas para ampliar a eficiência da PIVE em bovinos.

Com o intuito de melhorar a eficiência de PIVEs em bovino, faz-se interessante verificar qual o efeito da suplementação das proteínas identificadas por SILVA (2018) nos meios de maturação, fertilização e cultivo utilizados nesta biotécnica. Especial atenção deveria ser dada à Beta-NGF pelo que foi exposto anteriormente.

Para entender melhor a função da Beta-NGF é necessário compreender o ciclo estral bovino, que é a fase reprodutiva do animal, ocorrendo entre dois estros, ou seja, entre dois “cios” da fêmea. O estro é visto como o dia 0 do ciclo estral, e é neste período onde a fêmea começa a aceitar a monta e, logo em seguida, ovula, sendo que, quando não ocorre a fecundação, o intervalo entre dois estros é de aproximadamente 21 dias, podendo variar de 17 à 24 dias (COLAZO; MAPLETOFT, 2014; CUNHA *et al.*, 2019; VALLE, 1991).

A regulação endócrina do ciclo estral é realizada pelos hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-ovários. O hipotálamo produz GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas), que chega até a hipófise, ou glândula hipófise anterior, através do sistema porta-hipotalâmico-hipofisiário, estimulando a liberação de gonadotrofinas que são levadas pela corrente sanguínea até o ovário, sendo o hormônio folículo estimulante (FSH) que estimula o crescimento folicular e a hiperplasia nas células da granulosa e teca interna nos ovários, e o LH (hormônio luteinizante), que estimula a maturação e ovocitação dos folículos, além da produção de estradiol (estrógeno E2) pelas células da teca, e sua transformação juntamente com as células da granulosa, em corpo lúteo.

Desse modo, nos ovários, os folículos em desenvolvimento secretam estradiol e o corpo lúteo, progesterona (P4). O estradiol estimula a manifestação do estro (cio) e a liberação de LH, e a progesterona é importante para a manutenção da gestação (COLAZO; MAPLETOFT, 2014; CUNHA *et al.*, 2019; VALLE, 1991; SANTOS *et al.*, 2012).

De tal forma, divide-se o ciclo estral em duas fases: folicular e luteínica. A primeira, folicular, é a fase de desenvolvimento dos folículos ovarianos, sendo subdividida em proestro e estro. O proestro dura de 2 à 3 dias, e é onde a

progesterona circulante diminui, e em contrapartida, devido à liberação GnRH (pico pré ovulatório), o FSH aumenta, estimulando o crescimento folicular e conseqüentemente, a produção de estradiol e o início do estro (cio), assim como ocorre o aumento de LH, que atuará na maturação final do folículo. No estro, que dura de 12 à 18 horas, devido ao estímulo pelo estradiol, além de aceitarem a monta, as vacas ficam inquietas, com postura arqueada, cérvix dilatada, útero fortemente contraído, e com muco vaginal límpido (CUNHA *et al.*, 2019; VALLE, 1991; SOARES, JUNQUEIRA, 2019).

Dando continuidade, a segunda fase, a luteínica, é a fase de ovulação e de desenvolvimento do corpo lúteo, e divide-se em metaestro e diestro. No metaestro (de 2 à 3 dias), ocorre a ovulação (ruptura do folículo após 12h do fim do estro) e a formação do corpo lúteo através de células da parede do folículo rompido (teca e granulosa), e como resultado, tem-se o aumento da progesterona e a diminuição do FSH, LH e estradiol, e a fêmea já não aceita mais ser montada.

E por fim, no diestro, que dura aproximadamente 16 dias, a progesterona alcança sua concentração máxima e caso não ocorra à fecundação, o corpo lúteo é degenerado (luteólise), no proestro, através da prostaglandina F2a (PGF2a) produzida pelo endométrio, diminuindo a produção de progesterona e dando início à um novo ciclo. Caso contrário ocorrerá a liberação de interferon trofoblástico, que impede a secreção da prostaglandina, mantendo o corpo lúteo e a produção de progesterona, pois esta é capaz de modificar o ambiente uterino, a fim de possibilitar o desenvolvimento embrionário.

A progesterona modifica o ambiente uterino através da estimulação de mudanças na expressão gênica em células do endométrio, causando alterações no transporte de nutrientes, remodelação celular, angiogênese, proliferação e migração celular, e proteção dos tecidos contra células imunes da fêmea. (SOARES, JUNQUEIRA, 2019; CUNHA *et al.*, 2019; GALIMBERTI *et al.*, 2001; VALLE, 1991). A progesterona modifica o ambiente uterino através da estimulação de mudanças na expressão gênica em células do endométrio, causando alterações no transporte de nutrientes, remodelação celular, angiogênese, proliferação e migração celular, e proteção dos tecidos contra células imunes da fêmea (BAZER *et al.*, 2009; FORDE *et al.*, 2010).

Além disso, o bovino, sendo uma espécie monovulatória, tem seu desenvolvimento folicular de forma sincronizada, em grupos de folículos, o que se denomina onda folicular. Desse modo, ocorre o recrutamento de um grupo de folículos para iniciar seu crescimento, sendo apenas um deles selecionado para adquirir capacidade ovulatória, se desenvolvendo mais rapidamente, enquanto os outros folículos entram em atresia devido à secreção de estradiol e inibina pelo folículo dominante (SOARES, JUNQUEIRA, 2019). A foliculogênese pode ser dividida em 3 fases: o crescimento folicular pré-antral (transição do folículo primordial para primário e formação dos secundários), crescimento antral (desenvolvimento dos folículos antrais iniciais para seu crescimento), e a fase de crescimento antral terminal (os folículos antrais atingem o estágio pré-ovulatório) (LIMA *et al.*, 2016).

Quando *in vivo*, o folículo pré-ovulatório se rompe, liberando o ovócito na tuba uterina (ovulação), onde poderá ocorrer a fecundação. O embrião permanece na tuba uterina por alguns dias e na sequência segue para o útero onde continuara o seu desenvolvimento até o nascimento.

Para a produção *in vitro* de embriões, existem duas alternativas: a obtenção de ovócitos de animais vivos, ou a aspiração post mortem. Quando vivas, é possível realizar nas fêmeas a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia (OPU) (BUENO, BELTRAN, 2008), além da laparoscopia via flanco ou via vaginal. No post mortem, realiza-se a punção folicular diretamente dos ovários extraídos da fêmea normalmente abatidas em frigoríficos (MELLO *et al.*, 2016).

A eficiência do processo de punção está diretamente relacionada à quantidade, qualidade e morfologia do complexo cúmulo-ovócito (CCO) que será obtido para realização da PIVE. Além disso, *in vivo*, a maturação tem início após o pico pré-ovulatório de LH, mas assim que o CCO é aspirado do folículo, perdendo o contato com as células foliculares, inicia-se sua maturação (BUENO, BELTRAN, 2008; MELLO *et al.*, 2016). O ideal é que sejam aspirados folículos entre 2 e 8 mm, pois os menores não são capazes de reiniciar a meiose, e os maiores correm o risco de já estarem em processo de atresia ou maturação. Assim, o melhor momento para a aspiração é antes do pico de LH (GONÇALVES *et al.*, 2008).

A maturação *in vitro* dura de 18 a 22h, e o ovócito sofre mudanças nucleares (sai a fase de diplóteno da primeira prófase (meiose I) e atinge a metáfase II (meiose

II)), e citoplasmáticas, como o aumento da produção de lipídeos como fonte de energia, aproximação das mitocôndrias aos lipídeos, diminuição do Complexo de Golgi, alinhamento dos grânulos corticais próximos ao ovo para realizar o bloqueio celular, e detenção da síntese de ribossomos. Já as células do cúmulo, durante a maturação, produzem ácido hialurônico (muco), mucificando-se e expandindo.

O mecanismo de ação do ácido hialurônico não está totalmente elucidado, mas sabe-se que a remoção dessas células implica em queda nas taxas de fertilização, podendo estar associado à capacitação espermática e construção de uma camada protetora, criando um ambiente de seleção para os espermatozoides mais ativos, e prevenindo alterações da zona pelúcida (ZP). Após o tempo de maturação, o ovócito completa a expulsão do primeiro corpúsculo polar, se tornando apto à fecundação. Essas alterações ocorrem de modo a preparar o ovócito para a fecundação, que é a fase em que a transcrição dos genes voltará a ser realizada (BUENO, BELTRAN, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2008; MELLO *et al.*, 2016; SCANZANI, 2013).

Para que estes eventos ocorram *in vitro*, é necessário que o meio de cultivo onde ficam os ovócitos, durante 22h à 24h, mimetize as condições encontradas no sistema reprodutor da fêmea. Muitos laboratórios utilizam meios suplementados com soro fetal bovino (SFB), FSH, LH, e estradiol, em controle total de condições ambientais, como temperatura e atmosfera gasosa. Isso se deve ao fato de existirem junções intercomunicantes (GAP) no CCO, entre as células do cúmulo e o ovócito, que são importantes para a passagem de nutrientes e substâncias reguladoras da maturação (BUENO, BELTRAN, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2008; MELLO *et al.*, 2016).

Ao final da maturação, caso o ovócito seja fecundado, gerará o zigoto, que passará por repetidas divisões celulares, atingindo o estágio de mórula, com início da compactação dos blastômeros ou células embrionárias, retração do embrião (aumentando o espaço perivitelínico) e formação de junções de adesão e oclusão entre os blastômeros. Com a compactação e retração dos blastômeros, cria-se um gradiente osmótico, atraindo água para o espaço perivitelínico, criando a blastocele do blastocisto inicial. O blastocisto expandido contém sua blastocele aumentada,

devido à entrada de maior quantidade de água, que eventualmente provocará aumento do tamanho do embrião e redução da espessura da zona pelúcida (ZP), com sua posterior eclosão, onde o embrião será capaz de entrar em contato, diretamente, com os tecidos maternos através da implantação (BUENO, BELTRAN, 2008; MELLO *et al.*, 2016; VIANA, 2009).

Sabe-se que o plasma seminal, produzido nas glândulas sexuais acessórias masculinas, contém proteínas, fatores de crescimento, citocinas e hormônios, e já foi comprovada associação entre o contato com o sêmen e a indução da ovulação (RATTO *et al.*, 2019). Assim, foi identificado e purificado um componente bioquímico do plasma seminal de mamíferos que estimula a ovulação, nomeando-o fator de indução de ovulação (OIF) (ADAMS *et al.*, 2005).

Mais tarde, com a descoberta da neurotrofina, a beta subunidade do fator de crescimento nervoso (Beta-NGF), que já conhecidamente promove a sobrevivência e o crescimento neuronal, além de poder estar relacionada com fatores endócrinos ao ser absorvida através do endométrio e chegar ao sistema nervoso central onde influenciaria na liberação do hormônio luteinizante (LH), desencadeando a ovulação e o desenvolvimento do corpo lúteo (EL ALLALI *et al.*, 2017). Corroborando, a proteína Beta-NGF, quando administrada para fêmeas durante a inseminação, também melhora a função do corpo lúteo, podendo indicar que essa proteína melhora a fertilidade em bovinos (FENG; TAMADON; HSUEH, 2018; STEWART *et al.*, 2018).

Essa proteína age através de ligação em receptores de membrana plasmática de alta (TrkA) e baixa afinidade (p75) (REN *et al.*, 2005). Sendo receptores de neurotrofina, o p75 se enquadra na família dos receptores indutores de apoptose, e o TrkA é um receptor de tirosina quinase, específico para NGF, que estimula a prevenção da morte celular programada (apoptose) durante o desenvolvimento (BIBEL *et al.*, 1999). Dessa forma, a Beta-NGF possui uma maior afinidade pelo receptor TrkA, mas quando associado ao p75, seu estímulo é aumentado. No entanto, sem o TrkA, o p75 induz apoptose. (JANA; KOSZYKOWSKA; CZARZASTA, 2011).

Além disso, sabe-se que o receptor TrkA já foi encontrado em células da teca bovinas (STEWART *et al.*, 2018), ovários porcinos (JANA; KOSZYKOWSKA;

CZARZASTA, 2011) e ambos os receptores (TrkA e p75) foram encontrados em ovários de humanos, de ratos e porcos (EL ALLALI *et al.*, 2017). REN (2005) encontrou ainda ambos os receptores (TrkA e p75) em células da granulosa (cúmulo), da teca, intersticiais e do corpo lúteo, em ovários de cabras, além de em células epiteliais e musculares da ampola e do istmo da tuba uterina, e ainda em células epiteliais e glândulas do útero, dando forte indício de função parácrina e autócrina da Beta-NGF no sistema reprodutivo de cabras.

Entretanto, o receptor Trk possui os tipos TrkA, TrkB e TrkC (BIBEL *et al.*, 1999), sendo todos receptores de neurofinas, o TrkA, como já dito, se liga à NGF (fator de crescimento neuronal), o TrkB à BDNF e à NT4 (fator neurotrófico derivado do cérebro e neurotrofina 4) e o TrkC com o NT-3 (neurotrofina-3) (YAMAMOTO *et al.*, 1996; PIÑON *et al.*, 1996).

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 *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.

Recentemente CARRASCO *et al.* (2023) verificaram que a ovulação induzida por NGF em camelídeos não é mediada por uma via transsináptica dentro do hipotálamo, mas sim por um efeito de liberação nos tanócitos na eminência mediana de GnRH. Ou seja, ainda existem muitos detalhes a serem estudados sobre a ação do Beta-NGF na reprodução.

Diante das informações observadas, justifica-se a prática de mais estudos sobre a proteína Beta-NGF, especificamente em sua ação durante a fase de desenvolvimento embrionário inicial dos bovinos, testando principalmente seu mecanismo de ação que até então é pouco elucidado.

Dessa forma o objetivo com essa pesquisa foi avaliar o efeito da suplementação da proteína espermática Beta-NGF no meio de maturação de produção *in vitro* de embriões bovinos.

REFERÊNCIAS

- ABEL, Y.; REDERSTORFF, M. Gene expression knockdown by transfection of siRNAs into mammalian cells. **Methods in Molecular Biology**, v.1296, p.199-202, 2015.
- ABIEC. **Beef Report**: Perfil da pecuária no Brasil. Associação Brasileira das Indústrias Exportação de carne. 2022.
- ADAMS, G.P.; RATTO, M.H.; HUANCA, W.; SINGH, J. Ovulation-Inducing Factor in the Seminal Plasma of Alpacas and Llamas. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 3, p.452-457, 2005. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.105.040097>.
- BAZER, F.W.; SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; BURGHARDT, R.C.; WU, G. Comparative aspects of implantation. **Reproduction**, v. 138, n. 2, p.195-209, 2009. <http://dx.doi.org/10.1530/REP-09-0158>
- 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.
- CARRASCO, R.A.; PEZO, S.; ZWIEFELHOFER, E.M.; LANIGAN, E.E.; SINGH, J.; BERLAND, M.A.; ULLOA-LEAL, C.; RATTO, M.H.; ADAMS, G.P. Is seminal nerve growth factor-induced luteinizing hormone release in camelids mediated at the hypothalamus? **Reproduction**, v. 23, n. 4, p. 395-405, 2023.
- COLAZO, M. G.; MAPLETOFT, R. J. Fisiología del Ciclo Estral Bovino. **Revista Ciencias Veterinarias**, v. 16, n. 2, p.31-46, 2014. <http://dx.doi.org/10.19137/cienvet2014-1623>

CUNHA, J. M.; SANTOS, K.H.S.; AMORIM, A.R.; NEVES NETO, J.T.; DALL'ACQUA, P.C. Aspectos fisiológicos do ciclo estral em bovinos. *In: IV Colóquio estadual de pesquisa multidisciplinar, 2019, Mineiros/GO, Anais Colóquio Estadual de Pesquisa Multidisciplinar*, p. 1 – 2, 2019.

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.

FENG, Y.; TAMADON, A.; HSUEH, A. J. W. Imaging the ovary. **Reproductive BioMedicine Online**, v.36, p. 584-593, 2018.

FORDE, N.; BELTMAN, M.E.; DUFFY, G.B.; DUFFY, P.; MEHTA, J.P.; O'GAORA, P.; ROCHE, J.F.; LONERGAN, P.; CROWE, M.A. Changes in the Endometrial Transcriptome During the Bovine Estrous Cycle: Effect of Low Circulating Progesterone and Consequences for Conceptus Elongation. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 2, p. 266-278, 2010. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.110.085910>.

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**, v. 77, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2021.106645>

GALIMBERTI, A.M.; FONSECA, F.A.; ARAUJO, M.C.C.; COSTA, E.P.; FREITAS, C.; GUIMARÃES, J.D.; FERREIRA, A.M. Taxa de gestação e níveis plasmáticos de progesterona, em receptoras de embrião bovino, tratadas com busserelina após a inovulação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 2, p.353-359, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982001000200009>

GARCIA, S.; LUNARDELLI, P. A. SILVA, M. A.; ANCIOTO, K. L.; SILVA, J. O. F.; OLIVEIRA, E. C.; ZANGIROLAMO, A. F.; SENEDA, M. M.. 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 Rural**, v. 15 (supl.), p. 67, 2017.

GOMES, R. C.; FEIJÓ, G. L. D.; CHIARI, L. **Evolução e Qualidade da Pecuária Brasileira**. Nota Técnica. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2017, 4 p.

GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M.M.; VISINTIN, J.A.; COSTA, L.F.S. Produção in vitro de Embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2. ed. [s. L.]: Roca, 2008. Cap. 14. p. 261-289.

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>

JANA, B.; KOSZYKOWSKA, M.; CZARZASTA, J. Expression of Nerve Growth Factor and Its Receptors, TrkA and p75, in Porcine Ovaries. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, n. 4, p.468-474, 2011. <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.10-180h>

LIMA, L. F.; BRUNO, J.B.; SILVA, A.M.S.; DUARTE, A.B.G.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Importância das comunicações intercelulares para o desenvolvimento de folículos ovarianos. **Reprodução & Climatério**, v. 31, n. 2, p.93-104, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.recli.2015.12.005>.

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.

NAKAJIMA, K.; YAOITA, Y. Highly efficient gene knockout by injection of TALEN mRNAs into oocytes and host transfer in *Xenopus laevis*. **Biology Open** v. 4, n. 2, p. 180–185, 2015.

PIÑÓN, L.G.; MINICHELLO, L.; KLEIN, R.; DAVIES, A.M. Timing of neuronal death in *trkA*, *trkB* and *trkC* mutant embryos reveals developmental changes in sensory neuron dependence on Trk signalling. **Development**, v.122, n.10, p.3255-3261, 1996.

RATTO, M.H.; BERLAND, M.A.; SILVA, M.E.; ADAMS, G. New insights of the role of β -NGF in the ovulation mechanism of induced ovulating species. **Reproduction**, v.157, n. 5, p.199-207, 2019. <http://dx.doi.org/10.1530/REP-18-0305>.

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. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 3, p.399-404, 2005. <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.16082>.

SANTOS, J. *et al.* A produção in vitro de embriões bovinos no Brasil. Anais da XI Semana do Curso de Zootecnia da UEG– XI SEZUS, v. 11, n. 1, p. 40, 2017.

SANTOS, K.J.G.; SANTOS, A.P.P.; COSTA, M.A.; MONTESINOS, I.S. Biotecnologias reprodutivas e fisiologia reprodutiva da fêmea bovina – conhecimento para o sucesso. **Pubvet**, v. 6, n. 36, p.1478-1478, 2012.

SCANZANI, M. **Expansão do cumulus oophorus de oócitos bovinos maturados in vitro na presença de fosfatidilcolina ou ácido linoleico conjugado**. 2013. 48 f. Monografia (Especialização) - Curso de Biologia, Biologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013

SILVA, M. *et al.* Ovulation mechanism in South American Camelids: The active role of β -NGF as the chemical signal eliciting ovulation in llamas and alpacas. **Theriogenology**, v. 150, 2020. <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, n. 74, 2011.
<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. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

SOARES, P. H. A.; JUNQUEIRA, F. S. Particularidades reprodutivas da fêmea bovina: Revisão. **Pubvet**, v. 13, n. 1, p.1-6, 2019.
<http://dx.doi.org/10.31533/pubvet.v13n02a257.1-6>

STOJKOVIC, M.; MACHADO, A.S.; STOJKOVIC, P. et al. 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. **Biol. Reprod.**, v. 64, p.904-909, 2001.

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 corpus luteum formation and conceptus development in *Bos taurus* cows. **Theriogenology**, v. 106, p. 30–38, 2018.

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**, v. 83, p. 1394–1401, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.014>

USHIJIMA, H.; AKIYAMA; TAJIMA, T. Classification of morphological changes based on the number of cleavage divisions in bovine embryos. **Journal Reproduction Devenloped**, v. 55, p. 85-87, 2009.

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

VALLE, E. R. **O ciclo estral de bovinos e métodos de controle.** Campo Grande/ms: Embrapa-cnpgc, 1991. 33 p.

YAMAMOTO, M.; SOBUE, G.; YAMAMOTO, K.; TERAOKA, S.; MITSUMATA, T. Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75^{NGFR}, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. **Neurochemical Research**, v.21, n. 8, p.929-938, 1996. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02532343>.

CAPÍTULO 2 - 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*

RESUMO

O uso de biotecnologias tem se tornado cada vez mais frequente como modo de aumentar a eficiência da bovinocultura no Brasil. Uma das principais técnicas, a produção *in vitro* de embriões (PIVE), possibilita a produção de um número maior de bezerros por vaca de alto potencial genético em um menor período. Entretanto, por ser um processo de alto custo, pesquisas buscam meios de aumentar sua eficiência. Já foi identificado que a proteína Beta-NGF purificada do plasma seminal de mamíferos, quando administrada para fêmeas durante a inseminação, melhora a função do corpo lúteo. Do mesmo modo, também foi verificada uma correlação positiva entre a quantidade de Beta-NGF nos espermatozoides e as taxas de clivagem e blastocisto na produção *in vitro* de embriões, indicando possível atuação durante o desenvolvimento embrionário inicial. Objetivou-se com este estudo identificar receptores de Beta-NGF (p75 e Trk) nos ovócitos imaturos bovinos e suas células do cúmulo e verificar o efeito da suplementação com Beta-NGF do meio de maturação ovocitária em rotinas de produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE). Complexos cúmulo ovócito (COC) foram marcados por imunofluorescência indireta para receptores p75 e Trk e avaliados em microscopia confocal de varredura a laser. Também foram realizadas quatro rotinas de PIVEs, onde parte dos ovócitos foram maturados com meio suplementado com Beta-NGF e parte com meio não suplementado. Ambos os receptores foram localizados nos ovócitos e nas células do cúmulo. As PIVEs em que foi utilizado meio de maturação ovocitária suplementada com Beta-NGF tiveram melhores taxas de clivagem e de formação de blastocistos (teste t pareado, $p < 0,05$). Assim, ficou demonstrado que Beta-NGF atua tanto nos ovócitos como nas células granulosas, por meio de ambos os receptores, p75 e Trk, e que a suplementação do meio de maturação com Beta-NGF é uma alternativa para melhorar os resultados de PIVEs bovinas.

Palavras-chave: Beta-NGF, p75, Trk, bovino, ovócitos, maturação.

ABSTRACT

The use of biotechnologies has become increasingly frequent as a way to increase the efficiency of cattle reproduction in Brazil. One of the main techniques, *in vitro* embryo production, allows the production of a larger number of calves per cow with higher genetic potential in a shorter period. However, as it is a high-cost process, researchers are looking for ways to increase its efficiency. It has been identified that Beta-NGF, protein purified from seminal plasma of mammals, when administered to females during insemination, improves the function of the corpus luteum. Likewise, a positive correlation was also found between the amount of Beta-NGF in sperm and the rates of cleavage and blastocyst in the *in vitro* production of embryos, indicating possible action during the initial embryonic development. The aim of this study was to identify Beta-NGF receptors (p75 and Trk) in immature bovine oocytes and their cumulus cells and to verify the effect of Beta-NGF supplementation of the oocyte maturation medium in bovine embryo *in vitro* production routines. (PIVE). Cumulus oocyte complexes (COC) were marked by indirect immunofluorescence for p75 and Trk receptors and evaluated using laser scanning confocal microscopy. Four routines were also performed, where part of the oocytes were matured with medium supplemented with Beta-NGF and part with non-supplemented medium. Both receptors were located in oocytes and in the cells of the cumulus. Routines where oocyte maturation supplemented with Beta-NGF were used had better rates of cleavage and blastocyst formation (paired t-test, $p < 0.05$). Thus, it was demonstrated that Beta-NGF acts in both oocytes and granular cells, through both receptors, p75 and Trk, and that supplementation of the maturation medium with Beta-NGF is an alternative to improve the results of bovine *in vitro* embryo production.

Keywords: Beta-NGF, p75, Trk, bovine, oocytes, maturation.

2.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador de carne do mundo e a pecuária de corte é um dos principais ramos de seu agronegócio, além da produção de leite. Como modo de aumentar a eficiência da criação de gado, através da melhora do desempenho animal, utiliza-se de biotecnologias, principalmente durante a reprodução desses animais.

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem tido um papel importante nesse processo, pois, através da coleta de ovócitos de fêmeas saudáveis de alto valor genético, o processo gera um número maior de embriões em um menor período de tempo, que podem ser transferidos para outras fêmeas receptoras de menor valor genético, aumentando assim o valor genético dos bezerros nascidos, explorando o potencial reprodutivo dos rebanhos bovinos ao máximo, aumentando a demanda e tornando a carne e o leite mais acessível ao consumidor. Entretanto, o processo de PIVE é extremamente custoso e o cultivo *in vitro* é sua etapa menos eficiente, sendo que apenas 30% dos ovócitos maturados chegam ao estado de blastocistos (MELLO *et al.*, 2016; VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008).

Desse modo, pesquisas buscam estratégias que barateiem e aumentem a eficiência da aspiração folicular (OPU) e da produção *in vitro* de embriões (PIVE) (SANTOS *et al.*, 2017), que consiste na coleta, maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV), cultivo *in vitro* (CIV) e transferência de embriões (TE) produzidos *in vitro* (GARCIA, 2017). O enfoque está na mimetização das condições naturais as quais são expostos os ovócitos, zigotos, embriões e espermatozoides *in vivo*, de modo que busca-se compreender as exigências metabólicas e fisiológicas de tais estruturas, a fim de se estabelecer uma condição ideal para o seu desenvolvimento embrionário inicial (VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008).

SILVA (2018) identificou algumas proteínas na cabeça do espermatozoide associadas a uma melhor taxa de clivagem e algumas associadas a um melhor desenvolvimento embrionário. Dentre essas proteínas, a Beta-NGF se destacou por estar associada tanto à clivagem como com à formação de blastocistos. A proteína Beta-NGF, quando administrada para fêmeas durante a inseminação, também

melhora a função do corpo lúteo, podendo indicar que essa proteína melhoraria a fertilidade em bovinos (FENG; TAMADON; HSUEH, 2018; STEWART *et al.*, 2018).

Como SILVA (2018) identificou a presença da neurotrofina Beta-NGF na cabeça de espermatozoides de touro e também encontrou alta correlação da quantidade desta proteína com as taxas de clivagem e de blastocistos na produção *in vitro* de embriões bovinos, e como sabe-se que esta proteína age através de ligação em receptores de membrana plasmática de alta (TrkA) e baixa afinidade (p75) (REN *et al.*, 2005) a importância deste estudo se baseia na expectativa de descobrir se esta proteína está relacionada com o melhoramento da maturação ovocitária e do desenvolvimento embrionário inicial através da localização dos receptores em ovócitos imaturos e suas células do cúmulo e da suplementação do meio de maturação *in vitro* com Beta-NGF.

Dado o exposto, a importância deste estudo se baseia na expectativa de descobrir se esta proteína está relacionada com o melhoramento da maturação ovocitária e do desenvolvimento embrionário inicial de bovinos. Para isso, a localização de receptores de Beta-NGF nas estruturas envolvidas durante esse processo (espermatozoide, ovócito imaturo, ovócito maturado, zigoto, mórula e blastocisto) é o caminho para entender seu mecanismo de ação. Ademais, a suplementação dos meios com Beta-NGF, onde são mantidas tais estruturas, é uma ferramenta a ser utilizada, uma vez que, caso encontrados os receptores, e a suplementação demonstrar resultados estatisticamente significativos de melhora, a ação da proteína estaria comprovada naquela estrutura.

Este estudo buscou, em princípio, localizar os receptores de Beta-NGF, Trk e p75, apenas nos ovócitos imaturos, por serem as estruturas iniciais, e como forma de padronização de metodologia. Além disso, busca-se realizar a suplementação com a proteína Beta-NGF durante a maturação desses ovócitos, para que, futuramente, dando continuidade, todas as estruturas passem pelo mesmo processo de marcação e suplementação, além de uma quantificação dos receptores. Assim, espera-se que o melhor resultado em números de embriões viáveis ocorra ao se suplementar com Beta-NGF o meio onde é trabalhado o tecido com maior número de receptores para essa proteína, como o meio de maturação (onde são maturados os ovócitos), fertilização (onde os ovócitos maturados e espermatozoides são

reunidos para a fertilização, formando o zigoto) ou cultivo (onde as mórulas e blastocistos são cultivados).

Dessa forma, a proteína Beta-NGF poderá futuramente ser aplicada como suplemento de meios utilizados durante a produção *in vitro* de embriões bovinos, sendo que a escolha do melhor meio para ser suplementado dependerá do resultado destes futuros trabalhos. Assim, a eficiência dos processos seria aumentada, barateando sua técnica, diminuindo a perda embrionária inicial e melhorando a qualidade dos embriões produzidos, não apenas na bovinocultura, mas provavelmente durante a produção *in vitro* de outros mamíferos.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

Verificar a atuação da proteína Beta-NGF durante a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos.

2.2.2 Objetivos específicos

- Verificar a existência dos receptores da proteína Beta-NGF, p75 e Trk, no ovócito imaturo bovino e suas células do cúmulo.
- Verificar o efeito da suplementação de Beta-NGF no meio de maturação ovocitária durante a produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE).

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Vale destacar que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, com parecer Nº 106/2022/CEUA/PROPP/REITO

2.3.1 Suplementação com Beta-NGF durante a maturação

2.3.1.1 Dinâmica da produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões foi realizada em 4 semanas, com uma rotina fixa, denominando-se os dias como -1, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, em que em todo dia -1 realizou-se a suplementação do meio de maturação dos ovócitos imaturos (Tabela 1).

Tabela 1 - Dinâmica da produção *in vitro* de embriões bovinos, o todo dia 0 é onde ocorre a fertilização *in vitro* (FIV).

DIAS	ATIVIDADES
-1	Aspiração folicular <i>pós-mortem</i> Seleção e maturação <i>in vitro</i> (MIV) de ovócitos
0	Fertilização <i>in vitro</i> (FIV) de ovócitos maturados (após 22h de maturação)
1	Desnudamento (de 18 à 22h após a fecundação) e início do cultivo <i>in vitro</i> dos prováveis zigotos
2	Observação da taxa de clivagem (48h após a FIV) Embriões com \cong 2 células
3	Embriões com \cong 4 células
4	Embriões com \cong 8 células
5	Mórula
6	Blastocisto inicial
7	Contagem dos blastocistos (iniciais, expandidos, eclodidos)

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.3.1.2 Ovócitos e sêmen

Ovários foram coletados a partir de vacas abatidas em abatedouro comercial da cidade de Uberlândia, e transportados em garrafas térmicas contendo soro fisiológico a 37°C. Após lavar os ovários com solução salina, eles foram mantidos em banho maria a 37°C para aspiração folicular. Os folículos antrais ovarianos foram aspirados utilizando seringas de 5 mL e agulha 18G e o fluido aspirado foi transferido para tubos de 50 mL para a sedimentação, durante 15 minutos. O sedimento foi depositado em placas de poliestireno de 90 x 15 mm e o rastreamento dos ovócitos foi realizado com auxílio de microscópio estereoscópio.

Selecionaram-se os ovócitos classificados como grau I (ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração escura, com ausência de vacúolos, e células do cúmulo compactas com várias camadas) e grau II (ooplasma com pequenas áreas não homogêneas,

preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração escura, com ausência de vacúolos, e células do cúmulo compactas com pelo menos mais de 5 camadas) de acordo com a classificação de STOJKOVIC *et al.* (2001), pois representam os melhores ovócitos em qualidade para PIVEs (Figura 1).

As amostras de sêmen utilizadas nas PIVEs foram obtidas em central de processamento de sêmen (SEMBRA), de um touro de fertilidade comprovada. Em todo o trabalho utilizou-se apenas o sêmen de um único touro da raça Girolando.

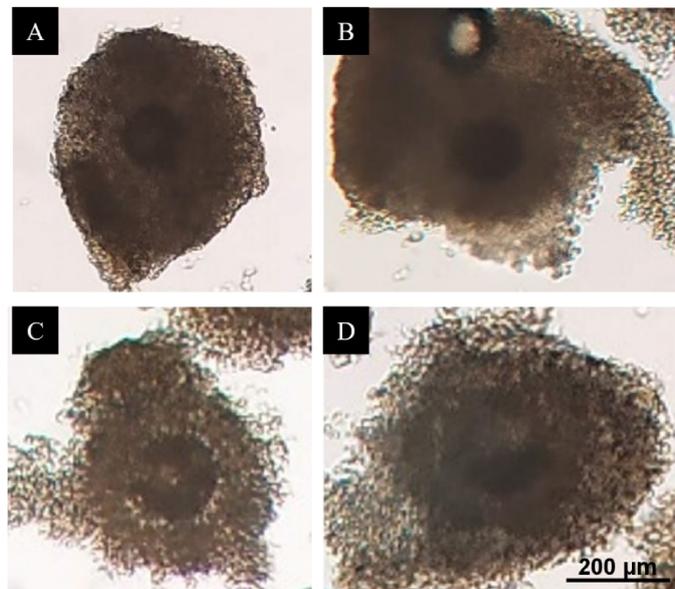


Figura 1 - Ovócitos utilizados nas PIVEs, classificados como grau I (A e B) e grau II (C e D) segundo Stojkovic (2001).
Fonte: Elaborado pelo autor.

2.3.1.3 Fixação dos ovócitos imaturos

Para posterior imunofluorescência, alguns dos complexos cúmulo ovócito selecionados foram fixados com paraformaldeído 4%, durante 1h, em geladeira (4°C). Após, foram lavados em PBS 1x (NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4) e armazenadas em microtubos com PBS 1x, lacrados com parafilme, em geladeira.

2.3.1.4 Maturação *in vitro* dos ovócitos

Os ovócitos rastreados foram depositados em uma placa de poliestireno de 35 x 10mm, contendo meio de lavagem TCM – 199 HEPES (0,2 mM piruvato sódico, 10 mM HEPES ácido, 10 mM de HEPES sódico, 5 mM bicarbonato de sódio, 83 µg/mL de amicacina, suplementado com 10% de soro fetal bovino), e a partir dessa placa foram selecionados segundo a classificação de Stojkovic (Figura 3), sendo contatos e depositados em uma nova placa com meio de lavagem. Uma terceira lavagem foi realizada em microgotas de 100 µL de meio de lavagem, e após foram divididos entre 6 gotas de 100 µL de meio de maturação TCM 199 com bicarbonato (0,2 mM piruvato sódico, 26 mM bicarbonato de sódio, 83 µg/mL de amicacina, 1 µg/mL FSH, 5 µg/mL LH, suplementado com 10% de soro fetal bovino). Neste experimento, 3 gotas foram suplementadas com 100 ng/mL da proteína isolada Beta-NGF (Thermo Fisher Scientific 11050HNAC), para posterior comparação entre as taxas de clivagem e formação de blastocistos entre os ovócitos mantidos nas 3 gotas controle e nas 3 gotas suplementadas. Escolheu-se a concentração de 100 ng/mL baseando-se no trabalho de CRISPO *et al.* (2016).

Finalmente, foram transferidos de 15 à 20 ovócitos por gota de 100 µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral em placas de petri de poliestireno de 60 x 15 mm, e mantidos por cerca de 22h em estufa na temperatura de 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂, para sua maturação (Figura 2).

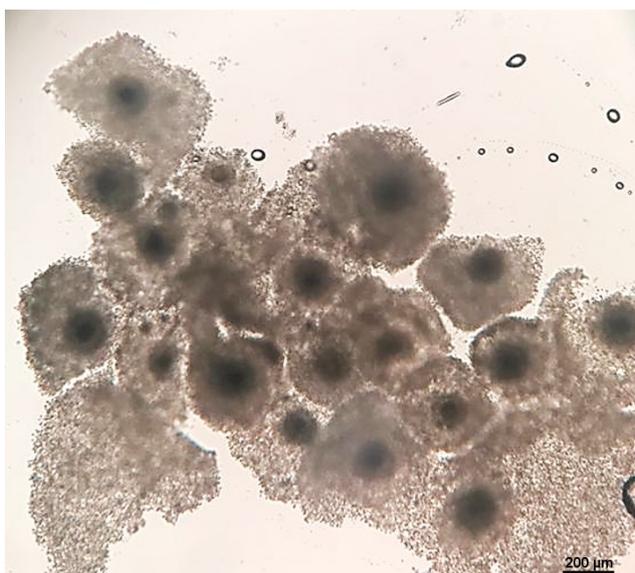


Figura 2 - Ovócitos maturados, após serem mantidos por 22h em meio de maturação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.3.1.5 Fertilização *in vitro*

Os ovócitos maturados (Figura 4) foram lavados três vezes 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 µM epinefrina, 10 µg/mL heparina, 6 mg/mL BSA e 83 µg/mL amicacina), e foram transferidos para gotas de 100 µL de meio TALP-Fert cobertas com óleo mineral em placas de poliestireno de 60 x 15 mm (Fig. 5). A fim de selecionar os espermatozoides viáveis, uma dose de sêmen foi descongelada em banho maria a 37°C por 30 segundos e foi depositada sobre um gradiente de Percoll, preparado previamente em um tubo Falcon de 15 mL, composto pela camada superior de Percoll 45% (500 µL de Percoll 90% e 500 µL de meio TALP-Sperm (Tyrode-albumina-lactato-piruvato, acrescido de 0,2 mM piruvato sódico e 83 µg/mL amicacina) e a camada inferior de 1 mL de Percoll 90% (Percoll, solução 10x, solução estoque 2mM CaCl₂, solução estoque 0,4 mM MgCl₂, 0,1 mM DL-ácido láctico e 20 mM bicarbonato de sódio).

O gradiente foi centrifugado a 2400 rpm, durante 30 minutos, e transferiu-se 30 µL do sedimento formado para um *ependorf* denominado tubo FIV (contendo 30 µL de meio TALP-Fert). Deste tubo, transferiu-se 5 µL para o tubo Motilidade (com 150 µL de meio TALP-Fert) e mais 5 µL para o tubo Concentração (com 250 µL de Água Milli-Q). O tubo FIV foi armazenado em estufa (38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂), com tampa aberta, até o momento da fertilização *in vitro*.

O conteúdo do tubo Motilidade foi utilizado para avaliação de motilidade, onde 30 µL foram colocados sob lâmina aquecida, coberta com lamínula, e analisada em objetiva de 10X, comparando-se a proporção, em porcentagem, de espermatozoides que apresentavam mobilidade de qualquer tipo (progressiva, oscilatória, circular ou retrógrada) com a quantidade de espermatozoides totais.

Já o conteúdo do tubo Concentração foi utilizado para análise deste mesmo fim, através de contagem em Câmara de Neubauer (objetiva de 40X, contagem dos 5 quadrados diagonais, considerando-se os espermatozoides presentes sob as linhas esquerdas e superiores), realizando-se uma média entre a contagem nas duas malhas da câmara. Para o cálculo de diluição dos espermatozoides utilizados na fertilização *in vitro* (tubo FIV), utilizou-se a seguinte fórmula:

(CONCENTRAÇÃO) X (MOTILIDADE) X 50 / 1000 – 50 = VOLUME DE TALP-FERT

Onde o resultado obtido é o volume, em microlitros, de meio TALP-Fert a ser acrescentado no tubo FIV. Ao final, cada gota foi fecundada com 4 µL do conteúdo final do tubo FIV (aproximadamente 100 mil espermatozoides por gota) e a placa foi mantida em estufa aquecida (38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂), de 18h à 22h.

2.3.1.6 Cultivo *in vitro*

Os prováveis zigotos foram desnudados mecanicamente por pipetações sucessivas, e após foram lavados 3 vezes em gotas de 100 µL de meio de cultivo SOF (acrescido de 0,2 mM piruvato sódico, 5 mg/mL BSA, 2,5% de soro fetal bovino e 83 µg/mL amicacina) e transferidos para gotas de 100 µL de meio SOF cobertas com óleo mineral em placas de poliestireno de 60 x 15 mm, sendo cultivados por 6 dias. A taxa de clivagem foi avaliada 48h após a fecundação *in vitro* por meio da avaliação das estruturas que apresentavam duas ou mais células, para fins de controle (Figura 3A). Sete dias após a fecundação, a taxa de blastocistos foi avaliada a partir da contagem de estruturas que alcançaram esse estágio de desenvolvimento, sem diferenciação entre blastocistos iniciais, expandidos ou eclodidos (Figura 3B).

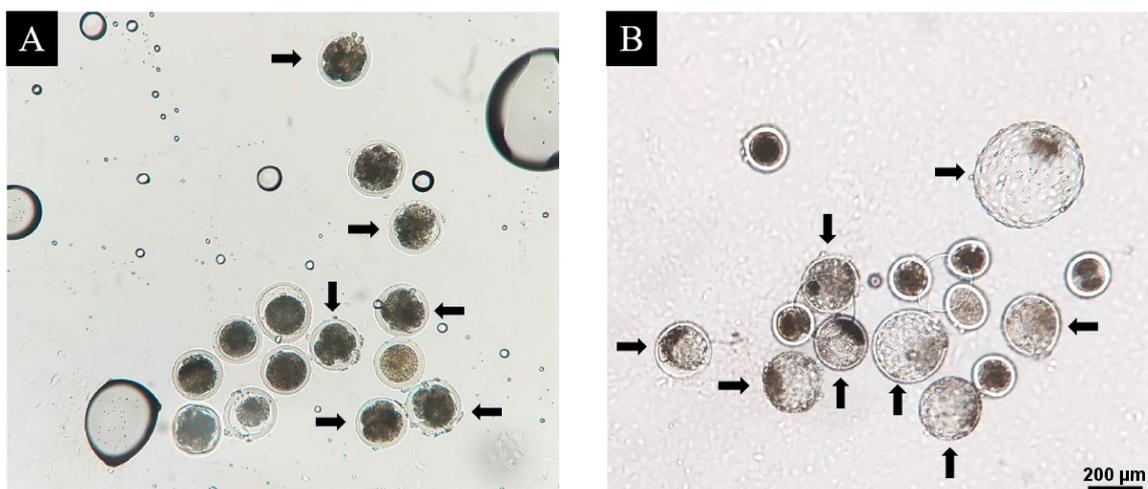


Figura 3 - A: embriões clivados no dia 2 (seta); B: blastocistos expandidos e eclodidos no dia 7 (seta).

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.3.1.7 Análise estatística das FIVs

A taxa de clivagem foi determinada 48 horas após a fertilização *in vitro* por meio de contagem dos embriões que apresentavam duas ou mais células com o auxílio de microscópio estereoscópico (taxa de clivagem = n° de embriões/ n° de ovócitos iniciais).

A contagem dos blastocistos foi realizada no sétimo dia após a fecundação. A taxa de blastocisto foi determinada em relação ao número de ovócitos que iniciaram a clivagem e chegaram a este estágio de desenvolvimento (taxa de blastocisto = n° de blastocisto/ n° de embriões utilizados para cálculo da taxa de clivagem).

Para verificar a existência de diferença entre o grupo suplementado e o não suplementado aplicou-se o teste T pareado, utilizando-se o software Excel/Action (Microsoft).

2.3.2 Imunofluorescência para identificação dos receptores p75 e Trk

Após fixados com paraformaldeído 4% e mantidos em solução de PBS 1x à 4°C, 15 ovócitos imaturos foram novamente lavados em solução de PBS 1x (acrescido de 2% de SFB) e divididos entre 3 lâminas silanizadas (silano 2,5%) para

melhor aderência das estruturas. Para a permeabilização da membrana plasmática, foi utilizada solução de Triton X-100 0,1%, durante 30 min, em temperatura ambiente. Após, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS 1x, durante 5 min cada vez.

A recuperação antigênica foi feita com completa imersão das lâminas em solução de Citrato de Sódio (pH 6), em fervura, por 10 min no micro-ondas (ciclos de 5 em 5 segundos). Após secagem, em temperatura ambiente por 20 min, as lâminas foram lavadas mais 3 vezes com PBS 1x. Os sítios inespecíficos foram bloqueados através de solução de Soro Fetal Bovino (1:9 diluído em PBS 1x), por 30 min, em temperatura ambiente. Após secagem, as lâminas foram divididas então em 3 grupos: 1) incubada com anticorpo primário policlonal de coelho anti-receptor p75 (NGFR-p75 Sigma N3908, 1:500), 2) incubada com anticorpos primários policlonal de coelho e anti-receptor Trk (Pan-Trk Abcam EPR17341, 1:250), e 3) lâmina controle, incubada com SFB (1:9 diluído em PBS 1x). As lâminas foram incubadas “overnight”, em câmara úmida, à 4°C.

Após 3 novas lavagens com PBS 1x, todas as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário (A11012 Alexa Fluor 594 Invitrogen, 1:500), por 2h, à temperatura ambiente, em sala escura e então lavadas 5 vezes com PBS 1x. Como corante de núcleos celulares, utilizou-se o Yo-Pro-1 Iodide (Y3603 Invitrogen, 2,5:1000), durante 40 min, em sala escura, exceto na lâmina controle (sem anticorpo primário). Após 5 lavagens com PBS 1x, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada (glicerol e tampão carbonato 1:9) e lamínula, sendo seladas com esmalte. A fluorescência foi analisada no microscópio confocal de varredura a laser Zeiss LSM 510-meta. A metodologia utilizada com foi adaptada de IDREES (2019), LI *et al.* (2010), PAN *et al.* (2019) e TAN *et al.* (2019).

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Suplementação com Beta-NGF no meio de maturação *in vitro* favorece as taxas de clivagem e blastocistos

Os resultados obtidos em cada rotina de PIVE estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Número de ovócitos imaturos, embriões clivados e blastocistos, nos grupos suplementado (S) e controle (C), em cada uma das rotinas.

Rotinas	1		2		3		4	
Grupos	S	C	S	C	S	C	S	C
Ovócitos imaturos	43	46	49	46	49	43	47	45
Clivados	33	32	31	23	35	25	29	24
Blastocistos	10	6	16	8	12	6	13	8

Fonte: Elaborado pelo autor

Através do Teste T Pareado, que comparou as taxas de clivagem e blastocisto entre os grupos suplementados e controle, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) em ambos os casos (Tabela 3).

Tabela 3 - Taxas de clivagem e de blastocistos obtidas em cada rotina de PIVE com meio suplementado com Beta-NGF e não suplementado e valor de p obtido na comparação dos grupos utilizando-se o teste T pareado.

Rotinas	Taxa de clivagem		Taxa de blastocistos	
	Suplementado	Controle	Suplementado	Controle
1	76,74%	69,57%	30,30%	18,75%
2	63,27%	50,00%	51,61%	34,78%
3	71,43%	58,14%	34,29%	24,00%
4	61,70%	53,33%	44,83%	33,33%
Médias	68,29%	57,76%	40,26%	27,72%
Valor de P	0,0072		0,0033	

Fonte: Elaborado pelo autor

2.4.2 Ovócitos imaturos e células do cúmulo expressam ambos os receptores de Beta-NGF (p75 e Trk)

A marcação pela técnica de imunofluorescência indireta, para se avaliar a expressão de receptores Trk e p75, analisada por microscopia confocal de varredura

a laser, demonstrou principalmente a presença de ambos os receptores nos ovócitos imaturos em si (Figuras 4 e 6). Ademais, ao dar enfoque às células do cúmulo, nota-se que estas também apresentam receptores p75 e Trk (Figuras 5 e 7). Os ovócitos imaturos da lâmina controle, que não foram incubados com o anticorpo primário e nem com o Yo-Pro-1 Iodide, não demonstraram fluorescência significativa.

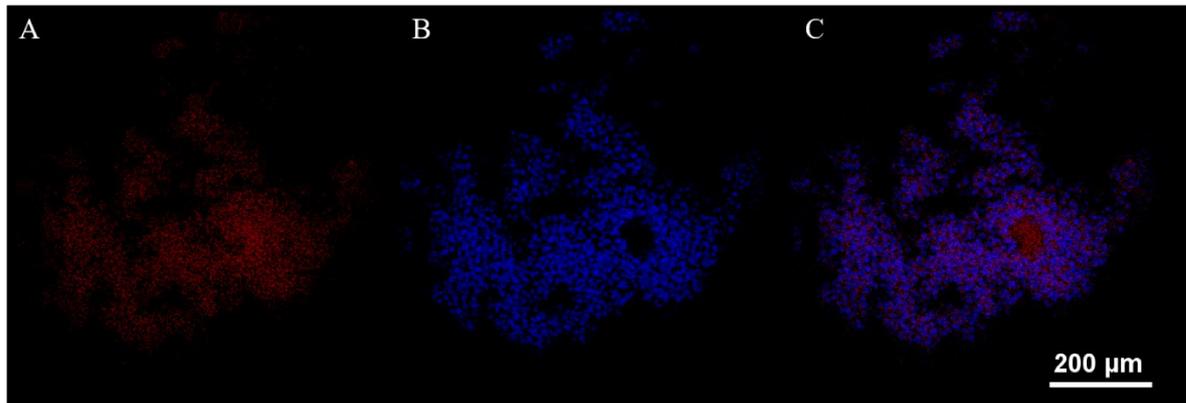


Figura 4 - Ovócito imaturo e células do cúmulo. Marcação de receptores p75 (A), marcação de núcleos com Yo-Pro-1 Iodide (B) e sobreposição de ambos (C).

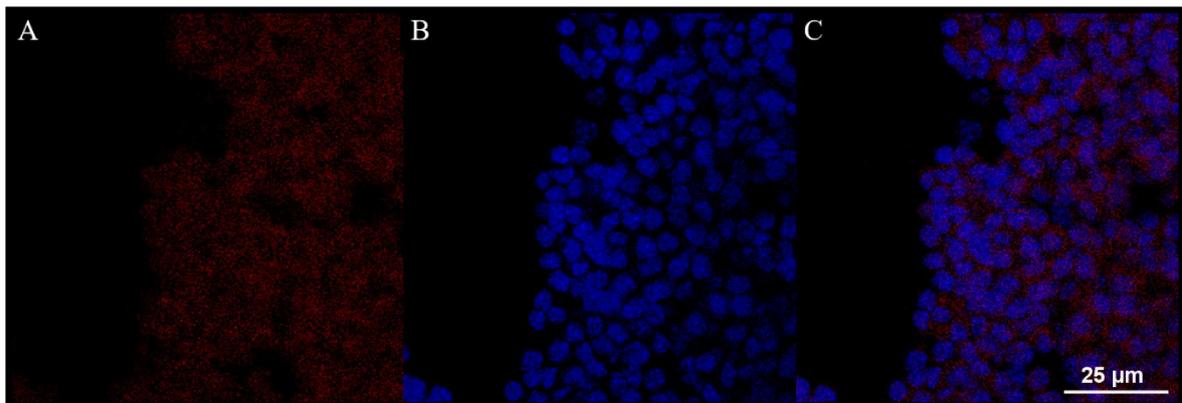


Figura 5 - Células do cúmulo de ovócito imaturo. Marcação de receptores p75 (A), marcação de núcleos com Yo-Pro-1 Iodide (B) e sobreposição de ambos (C).

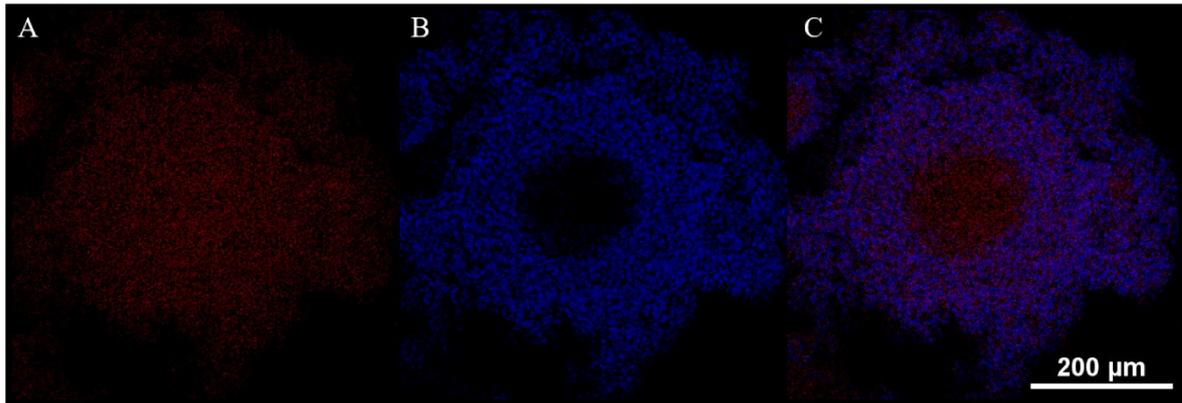


Figura 6 - Ovócito imaturo e células do cúmulo. Marcação de receptores Trk (A), marcação de núcleos com Yo-Pro-1 Iodide (B) e sobreposição de ambos (C).

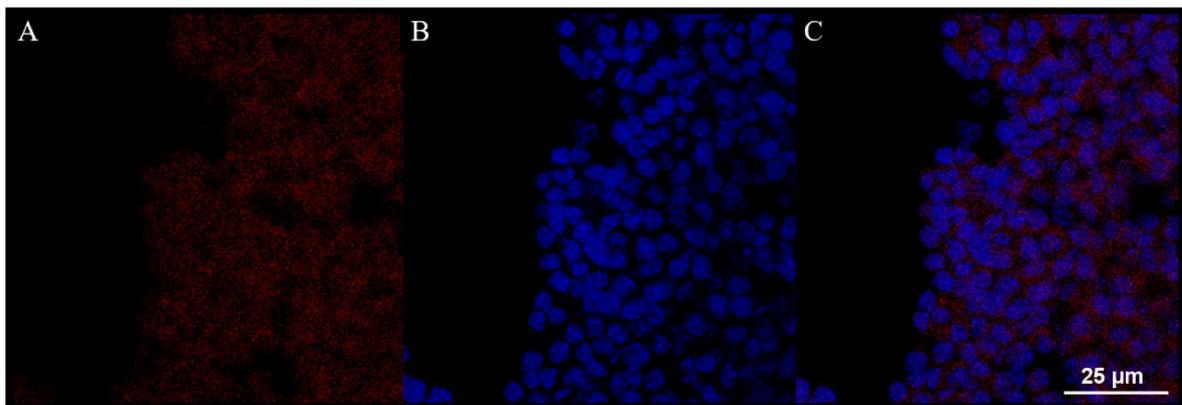


Figura 7 - Células do cúmulo de ovócito imaturo. Marcação de receptores Trk (A), marcação de núcleos com Yo-Pro-1 Iodide (B) e sobreposição de ambos (C).

2.5 DISCUSSÃO

Atualmente já se utilizam substâncias nutricionais e hormonais suplementares para melhorar o processo de maturação, como as gonadotrofinas (FHS, LH), líquido folicular ou sérico, hormônios tireoidianos, bem como estudos também já comprovaram a atuação positiva do fator de crescimento (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), ativina A e inibina A (SILVA *et al*, 2005).

Os resultados do presente trabalho demonstram que a suplementação com Beta-NGF em meio de maturação oocitária também tem atuação positiva neste processo. As mudanças nucleares e citoplasmáticas que ocorrem no complexo cúmulo ovócito (CCO), durante sua maturação, são de extrema importância para o

momento da fecundação, assim como para o desenvolvimento inicial do embrião. Dessa forma, as condições de maturação *in vitro*, como a composição do meio, temperatura, e atmosfera gasosa podem influenciar diretamente no sucesso da produção *in vitro* de embriões (PIVE).

Isso pode ser comprovado mediante comparação entre ovócitos maturados em meios e condições distintas, e suas taxas de formação de blastocistos subsequentes (SILVA *et al.*, 2005), assim como feito no presente trabalho. As melhores taxas de clivagem obtidas no grupo suplementado com Beta-NGF, mostram que um maior número de ovócitos provavelmente finalizou sua maturação. Já as melhores taxas de blastocistos obtidas neste mesmo grupo, demonstram que os efeitos benéficos da suplementação sobre a maturação ovocitária, permanecem durante o desenvolvimento embrionário inicial. Podemos assim especular que de forma geral, mesmo que a maturação ovocitária permita a fecundação e o início da clivagem, ela pode não ser suficiente para que o desenvolvimento embrionário inicial ocorra satisfatoriamente. Ou seja, especificamente em relação aos resultados deste trabalho, a suplementação do meio de maturação ovocitária com Beta-NGF não só aumentou o número de ovócitos maturados, como melhorou a qualidade destes ovócitos, já que a taxa de blastocisto foi melhor no grupo suplementado.

A presença de receptores tanto no ovócito como nas células do cúmulo corrobora com os bons resultados obtidos com a suplementação dos meios de maturação, pois o CCO possui comunicação intercelular entre si, através de projeções transzonais (TZP), sendo extensões das células do cúmulo que atravessam a zona pelúcida, chegando à membrana do ovócito. Neste ponto estão presentes junções comunicantes (GAP) e junções aderentes ou de oclusão (Figura 8), que são importantes para o desenvolvimento de ambas as estruturas, com a comunicação ocorrendo de maneira bidirecional (LIMA *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2012), permitindo que a proteína Beta-NGF e metabólitos produzidos pelas células do cúmulo cheguem até o ovócito.

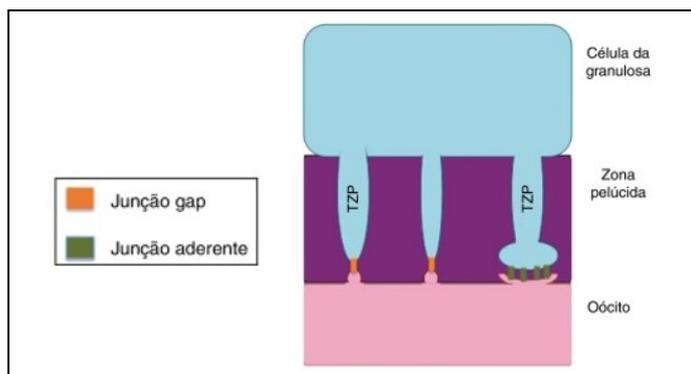


Figura 8 - Representação ilustrativa das projeções transzonais (TZP) entre ovócito e células da granulosa (cúmulo) e suas respectivas junções GAP e aderentes.

Fonte: Adaptado de LIMA *et al.* (2016).

Sabe-se que no período precedente à ovulação, ocorre certa retração das projeções transzonais (TZP) no folículo pré-ovulatório, para que este se desprenda da parede folicular e possa ocorrer a ovulação. Ao mesmo tempo, há um aumento de receptores TrkA e da expressão gênica de NGF, nas células da teca. Devido a isso, MAYERHOFER *et al.* (1996) concluíram que, através de bloqueio imunológico da ação da NGF e da ativação de seu receptor TrkA em ovários bovinos, inibe-se a ovulação, sugerindo que esta proteína estaria diretamente relacionada com a cascata ovulatória, visto que a ativação do receptor TrkA afeta a integridade das TZP.

Todavia, a estimulação dos folículos com outras neurotrofinas, como a NT3, a NT4, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o fator de crescimento epidermal, não causou alteração das TZP (MAYERHOFER *et al.*, 1996). Corroborando, o estudo de SHI *et al.* (2004), demonstraram que o LH funciona como regulador da produção de NGF e seus receptores, sendo que o LH estimula o processo de ovulação. Isso posto e considerando os resultados deste trabalho, fica claro que a Beta-NGF atua de formas diferentes: induzindo a ovulação e estimulando a maturação dos ovócitos.

Mais importante, o estudo de MAYERHOFER *et al.* (1996) comprova a produção de NGF pelas células da teca bovina, assim como outros estudos comprovam a expressão dessa proteína em ovários humanos (RETAMALES-ORTEGA *et al.*, 2017) e ovários de cricetos (hamsters) (SHI *et al.*, 2004). Desse modo, sugere-se que a aspiração folicular, tanto *in vivo* quanto *post mortem*, na

realização de rotinas de produção *in vitro* de embriões (PIVE), interrompe o contato do CCO com a Beta-NGF, e a suplementação dessa proteína no meio de maturação, mimetiza o ambiente de maturação *in vivo*, gerando uma melhor maturação e conseqüentemente, uma maior taxa de fecundação, clivagens e blastocistos gerados.

A cascata de ação do receptor TrkA é ativada através da ligação com a proteína Beta-NGF, ativando o fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e a proteína quinase (MAPK), a fim de promover a sobrevivência celular e sua proliferação. Ocorre a ativação da fosfolipase do tipo C γ (PLC γ), resultando na produção de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3), culminando na secreção de cálcio dos estoques citoplasmáticos. Entretanto, não se sabe muito sobre a cascata de ativação do receptor p75 (CHAVES *et al.*, 2012), mas sabe-se que mesmo que a Beta-NGF possua maior afinidade pelo receptor TrkA, quando este está associado ao p75, o estímulo é aumentado. No entanto, sem o TrkA, o p75 induz apoptose (JANA; KOSZYKOWSKA; CZARZASTA, 2011). No presente trabalho foi encontrado ambos os receptores, o que corrobora com os bons resultados obtidos com a suplementação com Beta-NGF.

Além disso, estudos já comprovaram a expressão da NGF e sua atuação durante a maturação meiótica, em ovócitos bovinos, murinos, suínos e de *Xenopus* (rãs) (SHI *et al.*, 2004; CARRIERO *et al.*, 1991; NEBREDA *et al.*, 1991; BARBONI *et al.*, 2002; PAPP *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005).

Em ovinos, analisou-se os níveis de NGF no fluido folicular antes e após 20h de estimulação com gonadotrofinas, e os resultados demonstraram que o GnRH causa um grande aumento de NGF nos folículos pré-ovulatórios, e através de imunohistoquímica, se confirmou a presença de receptores TrkA nas células do cúmulo. A estimulação com NGF (100 ng/mL) *in vitro*, induziu a expansão das células do cúmulo, e o desacoplamento com as células da teca (redução da TZP), além da retomada da meiose em mais de 70% dos ovócitos analisados, corroborando com a participação da Beta-NGF na maturação do ovócito (BARBONI *et al.*, 2002).

Em suínos, analisou-se o efeito da suplementação com NGF durante a maturação e a fertilização *in vitro*, e a taxa de blastocistos gerados, através de

cultivo de CCOs com NGF (1 ng/mL). Após 30h, uma maior proporção de ovócitos tratados com NGF atingiu o estágio de meiose II, mas após 40h, não houve diferença de proporção entre os grupos, simbolizando que a suplementação com NGF durante a maturação *in vitro* acelera a progressão nuclear (PAPP *et al.*, 2005).

Dado o exposto, tem-se que a suplementação do meio de maturação *in vitro* seria uma alternativa para melhorar os resultados de PIVEs, pois os resultados encontrados neste estudo demonstraram taxas estatisticamente maiores ($p < 0,05$) na formação de clivagens e blastocistos entre grupos de ovócitos expostos à suplementação com Beta-NGF durante o processo de maturação *in vitro*.

Entretanto, o anticorpo utilizado neste trabalho foi o anti-Pan Trk, sendo capaz de se ligar aos receptores TrkA, TrkB e TrkC. Os receptores TrkB e suas respectivas neurotrofinas (fator neurotrófico derivado do cérebro e N4) também foram identificados em ovários bovinos (SILVA *et al.*, 2005), dessa forma, seria viável em estudos futuros realizar a quantificação dos três tipos de receptores no CCO, analisando a proporção de cada receptor.

2.6 CONCLUSÃO

O presente estudo comprovou a presença em bovinos de receptores de Beta-NGF (Trk e p75) em ovócitos imaturos e em células do cúmulo do complexo cúmulo ovócito (CCO). Também pode-se verificar que a suplementação do meio de maturação ovocitária, na produção *in vitro* de embriões bovinos, leva a melhores taxas de clivagem e formação de blastocistos. Conclui-se então que a suplementação do meio de maturação ovocitária com Beta-NGF seria uma alternativa para melhorar os resultados de PIVEs bovinas.

REFERÊNCIAS

BARBONI, B.; MATTIOLI, M.; GIOIA, L.; TURRIANI, M.; CAPACCHIETTI, G.; BERARDINELLI, P.; BERNABÒ, N. Preovulatory rise of NGF in ovine follicular fluid: Possible involvement in the control of oocyte maturation. **Microscopy Research and Technique**, v. 59, n. 6, p.516-521, 2002. <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.10230>.

CARRIERO, F.; CAMPIONI, N.; CARDINALI, B.; PIERANDREI-AMALDI, P. Structure and expression of the nerve growth factor gene in *Xenopus* oocytes and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 29, n. 4, p.313-322, 1991. [Http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1080290402](http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1080290402).

CHAVES, R.N.; ALVES, A.M.; LIMA, L.F.; MATOS, H.M.; RODRIGUES, A.P.; FIGUEIREDO, J.R. Role of nerve growth factor (NGF) and its receptors in folliculogenesis. **Zygote**, v. 21, n. 2, p.187-197, 1 2012. <http://dx.doi.org/10.1017/s0967199412000111>.

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

CUNHA, J. M.; SANTOS, K.H.S.; AMORIM, A.R.; NEVES NETO, J.T.; DALL'ACQUA, P.C. Aspectos fisiológicos do ciclo estral em bovinos. In: IV Colóquio estadual de pesquisa multidisciplinar, 2019, Mineiros/GO, **Anais Colóquio Estadual de Pesquisa Multidisciplinar**, p. 1 – 2, 2019

FENG, Y.; TAMADON, A.; HSUEH, A. J. W. Imaging the ovary. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 36, n. 5, p.584-593, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.02.006>.

GARCIA, S. M. 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**, v. 15, n. 2, p.67-67, 2017. <http://dx.doi.org/10.7213/academica.15.s02.2017.33>.

GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M.M.; VISINTIN, J.A.; COSTA, L.F.S. Produção in vitro de Embriões. In: GONÇALVES, P.

B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2. ed. [s. L.]: Roca, 2008. Cap. 14. p. 261-289.

IDREES, M.; XU, L.; SONG, S.H.; JOO, M.D.; LEE, K.L.; MUHAMMAD, T.; EL SHEIKH, M.; SIDRAT, T.; KONG, I.K. PTPN11 (SHP2) Is Indispensable for Growth Factors and Cytokine Signal Transduction During Bovine Oocyte Maturation and Blastocyst Development. **Cells**, v. 8, n. 10, p.1272-1295, 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/cells8101272>.

JANA, B.; KOSZYKOWSKA, M.; CZARZASTA, J. Expression of Nerve Growth Factor and Its Receptors, TrkA and p75, in Porcine Ovaries. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, n. 4, p.468-474, 2011. <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.10-180h>

LI, C.; SUN, Y.; YI, K.; MA, Y.; SUN, Y.; ZHANG, W.; ZHOU, X. Detection of nerve growth factor (NGF) and its specific receptor (TrkA) in ejaculated bovine sperm, and the effects of NGF on sperm function. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p.1615-1622, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.033>.

LIMA, L. F.; BRUNO, J.B.; SILVA, A.M.S.; DUARTE, A.B.G.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Importância das comunicações intercelulares para o desenvolvimento de folículos ovarianos. **Reprodução & Climatério**, v. 31, n. 2, p.93-104, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.recli.2015.12.005>.

MAYERHOFER, A.; DISSEN, G.A.; PARROTT, J.A.; HILL, D.F.; MAYERHOFER, D.; GARFIELD, R.E.; COSTA, M.E.; SKINNER, M.K.; OJEDA, S.R. Involvement of nerve growth factor in the ovulatory cascade: trkA receptor activation inhibits gap junctional communication between thecal cells. **Endocrinology**, v. 137, n. 12, p.5662-5670, 1996. <http://dx.doi.org/10.1210/endo.137.12.8940397>.

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.

NEBREDA, A.R.; MARTIN-ZANCA, D.; KAPLAN, D.R.; PARADA, L.F.; SANTOS, E. Induction by NGF of meiotic maturation of *Xenopus* oocytes expressing the *trk* proto-oncogene product. **Science**, v. 252, n. 5005, p.558-561, 1991. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1850550>.

PAN, Y.; WANG, M.; BALOCH, A.R.; ZHANG, Q.; WANG, J.; MA, R.; XU, G.; KASHIF, J.; WANG, L.; FAN, J.; CUI, Y.; YU, S. FGF10 enhances yak oocyte fertilization competence and subsequent blastocyst quality and regulates the levels of CD9, CD81, DNMT1, and DNMT3B. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 10, p.17677-17689, 2019. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.28394>.

PAPP, A.B.; SOMFAI, T.; TARTAGLIONE, M.; VARGA, E.; GARDON, J.C. The effect of nerve growth factor on nuclear progression of porcine oocytes during in vitro maturation and embryo development. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 53, n. 1, p.91-101, 2005. <http://dx.doi.org/10.1556/avet.53.2005.1.9>.

PINHEIRO, P. Md.saúde (Ed.). **Processo de evolução**. 2019. Disponível em: <<https://www.mdsaude.com/ginecologia/ovulacao/>>. Acesso em: 18 jan. 2020.

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. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 3, p.399-404, 2005. <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.16082>.

RETAMALES-ORTEGA, R.; ORÓSTICA, L.; VERA, C.; CUEVAS, P.; HERNÁNDEZ, A.; HURTADO, I.; VEJA, M.; ROMERO, C. Role of Nerve Growth Factor (NGF) and miRNAs in Epithelial Ovarian Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p.507-524, 2017. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18030507>.

SANTOS, K.J.G.; SANTOS, A.P.P.; COSTA, M.A.; MONTESINOS, I.S. Biotecnologias reprodutivas e fisiologia reprodutiva da fêmea bovina – conhecimento para o sucesso. **Pubvet**, v. 6, n. 36, p.1478-1478, 2012.

SANTOS, J. *et al.* A produção in vitro de embriões bovinos no Brasil. Anais da XI Semana do Curso de Zootecnia da UEG– XI SEZUS, v. 11, n. 1, p. 40, 2017.

SHI, Z.; JIN, W.; WATANABE, G.; SUZUKI, A.K.; TAKAHASHI, S.; TAYA, K. Expression of Nerve Growth Factor (NGF), and Its Receptors trkA and p75 in Ovaries of the Cyclic Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*) and the Regulation of Their Production by Luteinizing Hormone. **Journal of Reproduction and Development**, v. 50, n. 6, p.605-611, 2004. <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.50.605>.

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.

SILVA, S. J. M. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor promotes bovine oocyte cytoplasmic competence for embryo development. **Reproduction**, v. 129, n. 4, p.423-434, abr. 2005. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/rep.1.00471>.

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 corpus luteum formation and conceptus development in *Bos taurus* cows. **Theriogenology**, v. 106, p.30-38, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.007>.

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. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 3, p.904-909, 2001. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>.

TAN, J.; ZOU, Y.; HUANG, Z.H.; ZHANG, Z.Q.; WU, L.P.; WU, X.W.; WAN, X.J.; XIN, C.L.; WU, Q.F. C-kit signaling promotes human pre-implantation 3PN embryonic development and blastocyst formation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.17, n. 1, p.75-75, 2019. <http://dx.doi.org/10.1186/s12958-019-0521-8>.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p.100-109, 2008.

CAPÍTULO 3 - EFEITO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE B-NGF NO MEIO DE MATURAÇÃO OVOCITÁRIA

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma das biotecnologias mais utilizadas na pecuária atualmente. Dentre suas vantagens, se destaca o aceleração genético proporcionado por essa técnica. Porém, trata-se de um procedimento de alto custo e com um baixo aproveitamento, a conversão de ovócitos em blastocistos ainda é pouco eficiente. Já foi identificado que a proteína Beta-NGF, quando administrada para fêmeas durante a inseminação, melhora a função do corpo lúteo. Além disso, também foi verificada uma correlação positiva entre a quantidade de Beta-NGF nos espermatozoides e as taxas de clivagem e blastocisto na produção *in vitro* de embriões, o que indica possível atuação durante o desenvolvimento embrionário inicial. Assim, o objetivo desse trabalho foi 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 dez rotinas de PIVE, utilizando ovários de frigorífico e sêmen de fertilidade comprovada. O experimento foi dividido em três grupos, um grupo controle (sem suplementação), um grupo com 100ng/ml de suplementação e um grupo com 500ng/ml de suplementação. A taxa de clivagem foi superior no grupo suplementado com 100ng/ml ($p < 0,004$). O grupo 500ng/ml não apresentou diferença ao grupo controle, o que sugere efeito citotóxico dessa concentração. A produção de blastocistos não apresentou diferença ($p > 0,07$) entre os três grupos, apenas uma diferença numérica que pode ser explicada pelo baixo número de rotinas. Já a taxa de eficiência da PIVE foi satisfatória, com o grupo de 100ng/ml sendo superior ($p > 0,005$) que os demais. A partir dos resultados obtidos, pôde-se concluir que a suplementação do meio de maturação com 100ng/mL de NGF influencia positivamente na eficiência da PIVE, uma vez que favorece a clivagem bem como o desenvolvimento embrionário inicial até blastocisto.

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

ABSTRACT

In vitro embryo production (IVEP) is one of the most used biotechnologies in livestock today. Among its advantages, the genetic acceleration provided by this technique stands out. However, it is a high-cost procedure with low utilization, the conversion of ovules into blastocysts is still inefficient. It has already been identified that the Beta-NGF protein, when controlled for female during insemination, improves the function of the corpus luteum. In addition, a positive capacity was also verified between the amount of Beta-NGF in sperm and cleavage and blastocyst rates in in vitro embryo production, which indicates possible action during early embryonic development. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect on the in vitro production of bovine embryos of two different concentrations of β -NGF in the oocyte medium. For this, ten PIVE routines were performed, using refrigerator ovaries and proven fertility semen. The experiment was divided into three groups, a control group (without supplementation), a group with 100ng/ml of supplementation and a group with 500ng/ml of supplementation. The cleavage rate was higher in the group supplemented with 100ng/ml ($p < 0.004$). The 500ng/ml group showed no difference from the control group, which suggests a cytotoxic effect of this concentration. The production of blastocysts did not differ ($p > 0.07$) between the three groups, only a numerical difference that can be explained by the low number of routines. The IVP efficiency rate was satisfactory, with the 100ng/ml group being superior ($p > 0.005$) than the others. From the results obtained, it could be concluded that supplementation of the advancement medium with 100ng/mL of NGF positively influences the efficiency of PIVE, since it favors the cleavage as well as the initial embryonic development up to the blastocyst.

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

3.1 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 biotécnicas, sendo a produção *in vitro* de embriões (PIVE) uma das principais.

Essa técnica permite, por exemplo, um grande aumento na produção de bezerros 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 consequente 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 concepto (STEWART *et al.*, 2018).

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.

3.2 OBJETIVOS

Objetivou-se avaliar 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.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Vale destacar que o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, com parecer N° 106/2022/CEUA/PROPP/REITO

3.3.1. 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 rastreamento 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 em rotinas de PIVE do nosso grupo.

3.3.2 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.

3.3.3 Fertilização *in vitro*

Após maturados, os ovócitos passavam por 3 lavagens em microgotas de 100 μ L de meio Talp-fert (suplementado com 0,2 mM piruvato sódico, 20,4 μ M penicilamina, 10,2 μ M hipotaurina, 1,97 μ M epinefrina, 10 μ g/mL heparina, 6 mg/mL BSA e 83 μ g/mL amicacina), e eram transferidos para gotas de 100 μ L de meio Talp-fert cobertas com óleo mineral em placas de poliestireno de 60 x 15 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 μ L de Talp-sperm e 500 μ 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 900xg, durante 30 minutos. Realizada a centrifugação, era transferido 30 μ L do sedimento formado no fundo do tubo, com auxílio de uma micropipeta, para um tubo contendo 30 μ L de meio Talp-fert (TUBO FIV) para correção da concentração e capacitação dos espermatozoides serem utilizados na FIV. Cinco microlitros do tubo FIV foram transferidos para outro tubo com 150 μ L de meio Talp-fert, a fim de se avaliar a motilidade (tubo motilidade), e, 5 μ L para outro contendo 250 μ 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 μ 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 μ L.

Era feita, então, a adição de 4 μ 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.

3.3.4 Cultivo *in vitro*

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

A taxa de clivagem foi 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 blastocisto 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 blastocisto = 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 blastocistos, uma vez que esta foi calculada a partir dos ovócitos que iniciaram o processo de clivagem.

3.3.5 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.

3.4 RESULTADOS

Foram realizadas dez rotinas de PIVE, totalizando 1360 ovócitos, sempre divididos de forma aleatória no três grupo: controle, 100ng/ml e 500 ng/ml. As taxas de clivagem, blastocistos e eficiência das PIVEs estão demonstradas nas Figuras 1, 2 e 3, respectivamente.

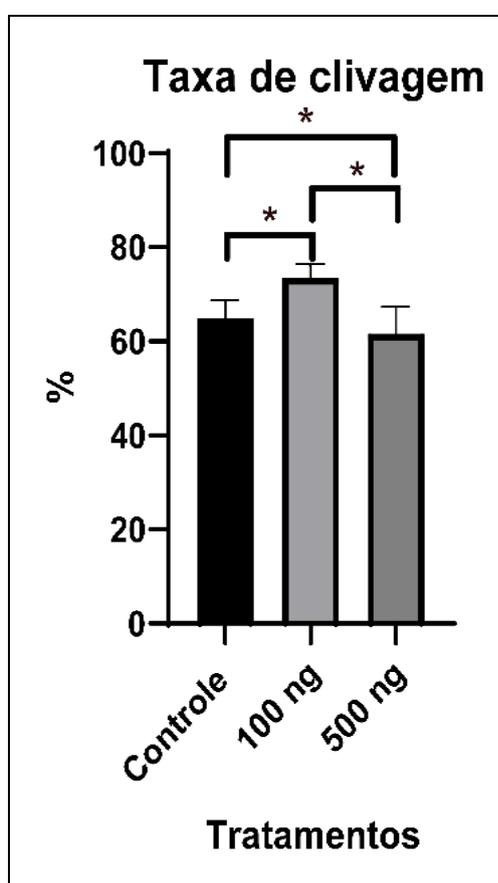


Figura 1 – Gráfico demonstrando a média e o erro padrão das taxas de clivagem dos ovócitos do Grupo Controle, Grupo com 100ng de NGF e Grupo com 500ng de NGF em meio de maturação.

Os resultados obtidos e a avaliação estatística mostram que, quanto à 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.

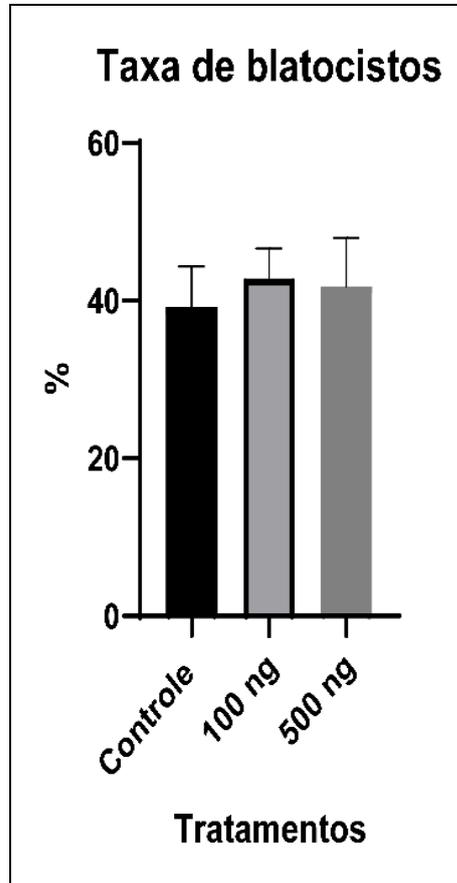


Figura 2 - Gráfico demonstrando a média e o erro padrão das taxas de blastocisto dos ovócitos do Grupo Controle, Grupo com 100ng de NGF e Grupo com 500ng de NGF em meio de maturação.

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

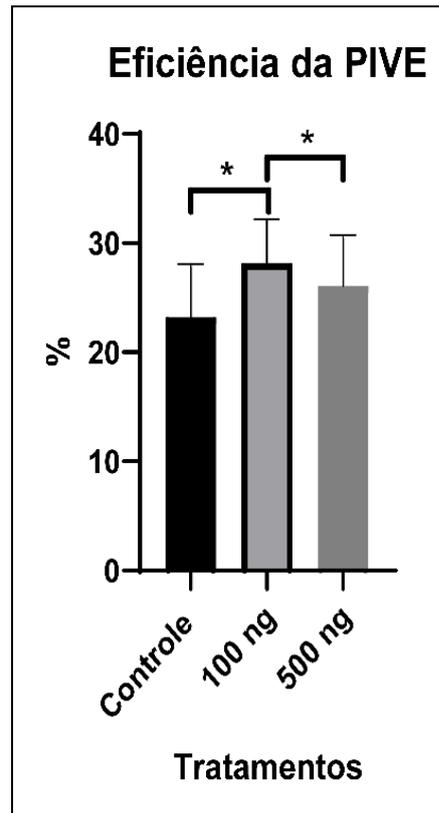


Figura 3 - Gráfico demonstrando a média e o erro padrão representativo da Eficiência da PIVE no Grupo Controle, Grupo com 100 ng de NGF e Grupo com 500 ng de NGF no meio de maturação.

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.

3.5 DISCUSSÃO

Este estudo é pioneiro ao avaliar concentrações diferentes de suplementação com Beta-NGF nos meios de produção de embrião bovino *in vitro*. Concentrações ideais são fundamentais para o resultado satisfatório, e assim como mostra o nosso trabalho, nem sempre um volume exagerado pode trazer melhoras ao processo. Estabelecer uma concentração ótima a ser utilizada é fundamental para que possamos aperfeiçoar o uso da técnica, obtendo melhores resultados.

A Figura 1 apresenta os resultados da taxa de clivagem, ou seja, quantos ovócitos foram fecundados e conseguiram iniciar o processo de divisão celular, esta etapa é avaliada 48 horas após a fecundação e não leva em consideração embriões que possam ter iniciado a divisão por partenogêneses.

A primeira figura mostra que a melhor concentração é a de 100ng/ml, superando o grupo controle e o grupo suplementado com 500ng/ml. Observamos ainda que o grupo 500ng/ml é pior que o grupo controle, ou seja, nessas concentrações a proteína suplementada atrapalhou a taxa de clivagem dos possíveis zigotos.

No experimento descrito no segundo capítulo dessa tese, demonstramos existência de receptores da Beta-NGF tanto nos ovócitos como nas células do cúmulo, mostrando assim que a NGF pode agir nessas células. (LIMA *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2012) afirmam ainda que existem junções comunicantes entre essas estruturas, o que pode justificar o melhor resultado quando suplementado, pois, a proteína pode melhorar a comunicação, mimetizando o processo que ocorre na ovulação fisiológica.

O útero bovino mantém uma troca local de contracorrente entre a drenagem venosa uterina e a artéria ovariana que permite o transporte direto de prostaglandinas F2 α (PGF2 α) do útero para o ovário durante a luteólise (MAYERHOFER *et al.*, 1996. RENTMALES-ORTEGA *et al.*, 2017). Este mecanismo anatômico também poderia fornecer uma rota potencial para o NGF viajar e interagir diretamente com o ovário (STEWART *et al.*, 2022). Assim a suplementação atuaria suprimindo a ausência desse processo que ocorre quando aspiramos os ovários.

O grupo 500ng/ml pode ter apresentado uma maior produção de espécies reativas de oxigênio, autores como (ESTERBAUER, SCHAUR, ZOLLNER, 1991; EVANS, DIZDAROGLU, COOKE, 2004; PARK *et al.*, 2010; RICHTER, 1987), afirmam que níveis supra fisiológicos dessas substâncias podem prejudicar diversas cascatas de sinalização, e a célula pode ser afetada pela peroxidação lipídica, podendo ainda aumentar a apoptose e morte celular, prejudicando assim os resultados.

A Figura 2 apresenta os resultados da taxa de blastocisto, que foram avaliados sete dias após a fecundação, não foi observada nenhuma diferença entre

os tratamentos, apenas um aumento numérico no grupo 100ng/ml. LIMA *et al.* (2020) afirma que o aumento da Beta-NGF proporciona um aumento na liberação de LH, o que pode melhorar a eficiência de conversão. Porém MATIOLLI *et al.*, (1999), observou que também é necessário um aumento de LH e FSH, para que possamos ter a ativação de NGF, talvez, durante o cultivo embrionário, a baixa desses hormônios pode ter prejudicado o crescimento dos zigotos, justificando a ausência de diferença estatística na produção de blastocisto.

LIMA *et al.* (2020) observaram que a suplementação no cultivo de células ovarianas aumentou a produção esterogênica e de testosterona, mas não observaram aumento de progesterona e estradiol, provando que a NGF pode interagir com células da teca e da granulosa. Estudos têm demonstrado que o NGF mantém suas propriedades luteotrópicas quando administrado sistemicamente a bovinos (STEWART *et al.*, 2018). Enquanto o efeito luteotrópico em camelídeos é atribuído à secreção prolongada de LH da hipófise anterior, em bovinos, há evidências de que o NGF pode atuar diretamente no ovário (DISSEN *et al.*, 2000). Contudo, ao observamos um tendência para melhores resultados no grupo 100ng/ml, e diante dos achados na literatura, acreditamos que um possível aumento no número de rotinas poderia proporcionar diferença estatística na produção de blastocistos.

A Figura 3 mostra a eficiência do processo de produção *in vitro*, ou seja, das células que clivaram, quantas conseguiram chegar ao estágio de blastocisto. Mais uma vez o grupo de 100ng/ml apresentou melhor resultado, superando o grupo controle e o grupo 500ng/ml, estes não apresentaram diferenças entre si. (SAEEDNIA *et al.*, 2016; PARTHIPAN *et al.*, 2017.) destacam que experimentos com a proteína suplementada nos meios de congelamento de sêmen não atrapalharam a morfologia da célula, da mesma forma acontece nos ovócitos, que não apresentam morfologia afetada e ainda melhoram o seu desempenho de conversão dos zigotos em blastocistos. Esse resultado mostra que os benefícios apresentados durante a fase de maturação dos ovócitos não se limitam a essa etapa, permanecendo durante todo o processo de desenvolvimento embrionário inicial.

Nessas condições podemos criar a hipótese que a suplementação no meio de maturação com a proteína melhora a quantidade e também a qualidade dos embriões. Em análises que até o momento são apenas descritivas, já observamos o

aceleramento no crescimento das estruturas suplementadas, ou seja, elas atingem estágios de desenvolvimento superiores as células não suplementadas. Característica que também pode proporcionar melhores resultados ao transferir esses embriões.

Em resumo, pode-se afirmar que o protocolo estabelecido com a concentração de 100ng/ml é viável, melhora a taxa de clivagem e proporciona uma tendência de melhora na taxa de blastocisto, além de proporcionar um desempenho superior no processo de produção *in vitro* de embriões bovinos.

3.6 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

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>

DISSEN, G. A.; PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K.; HILL, D. F.; COSTA, M. E.; OJEDA, S. R. Direct effects of nerve growth factor on thecal cells from antral ovarian follicles. *Endocrinology*. v. 141, p. 4736–50, 2000. doi: 10.1210/endo.141.12.7850

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>

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.

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.

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>

LIMA,F.S. STEWARD, J.J., CANISSO, I.F. Insights into Nerve Growth Factor- β role in bovine reproduction – **Theriogenology** , 19 de fevereiro de 2020 , 150: 288-293 DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.076, 2020

MAYERHOFER, A.; DISSEN, G.A.; PARROTT, J.A.; HILL, D.F.; MAYERHOFER, D.; GARFIELD, R.E.; COSTA, M.E.; SKINNER, M.K.; OJEDA, S.R. Involvement of nerve growth factor in the ovulatory cascade: trkA receptor activation inhibits gap junctional communication between thecal cells. **Endocrinology**, v. 137, n. 12, p.5662-5670, 1996. <http://dx.doi.org/10.1210/endo.137.12.8940397>.

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)>.

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.

RATTO, M.H.; BERLAND, M.A.; SILVA, M.E.; ADAMS, G. New insights of the role of β -NGF in the ovulation mechanism of induced ovulating species. **Reproduction**, v.157, n. 5, p.199-207, 2019. <http://dx.doi.org/10.1530/REP-18-0305>.

RETAMALES-ORTEGA, R.; ORÓSTICA, L.; VERA, C.; CUEVAS, P.; HERNÁNDEZ, A.; HURTADO, I.; VEJA, M.; ROMERO, C. Role of Nerve Growth Factor (NGF) and miRNAs in Epithelial Ovarian Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p.507-524, 2017. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18030507>.

RICHTER, C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 44, p. 175–189, 1987.

SAEEDNIA, S.; NASHTAEI, M.; BAHADORAN, H.; ALEYASIN, A.; AMIDI, F. Effect of nerve growth factor on sperm quality in asthenozoospermic men during cryopreservation. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 14, p. 1–8 2016. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0163-z>.

SANTOS, K.J.G.; SANTOS, A.P.P.; COSTA, M.A.; MONTESINOS, I.S. Biotecnologias reprodutivas e fisiologia reprodutiva da fêmea bovina – conhecimento para o sucesso. **Pubvet**, v. 6, n. 36, p.1478-1478, 2012.

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 corpus luteum 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>

STEWART Jamie L., GAO Liying, FLAWS Jodi A., Mercadante Vitor R. G., Dias Nicholas W., Canisso Igor F., Lima Fabio S Effects of Nerve Growth Factor- β From Bull Seminal Plasma on Steroidogenesis and Angiogenic Markers of the Bovine Pre-ovulatory Follicle Wall Cell Culture. **Frontiers in Veterinary Science**, volume 8.2022 DOI=10.3389/fvets.2021.786480 2022

CAPÍTULO 4 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE BETA-NGF NO MEIO DE MATURAÇÃO OVOCITÁRIA IN VITRO SOBRE A ESTRUTURA CITOPLASMÁTICA DO OVÓCITO BOVINO.

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 ocorrem 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. Desta forma, o presente estudo avaliou a estrutura citoplasmática dos ovócitos maturados *in vitro*, com e sem suplementação de beta-NGF, por meio da análise de mitocôndrias, espécies reativas de oxigênio (EROs) e apoptose e necrose celular. Os resultados mostraram que a suplementação induziu o aumento na quantidade de mitocôndrias, além de reduzir a produção de EROs e conseqüentemente da apoptose e morte celular. Assim, é possível concluir que a suplementação com Beta-NGF atua de forma positiva na produção de embriões *in vitro*.

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

ABSTRACT

Cattle raising, both beef and milk, are important activities in the protein production chain in Brazil. Therefore, biotechnologies are sought to improve the quality of these productions, as is the case of in vitro embryo production (IVP). An important phase for PIVE is the in vitro maturation of oocytes, as this is the moment when transformations occur that directly influence fertilization and early embryonic development. It was recently described that the addition of Beta-NGF (Nerve growth factor) in the oocyte maturation medium increases the efficiency of PIVE in cattle. Thus, the present study evaluated the cytoplasmic structure of oocytes matured in vitro, with and without beta-NGF supplementation, through the analysis of mitochondria, reactive oxygen species (ROS) and cell apoptosis and necrosis. The results showed that supplementation induced an increase in the amount of mitochondria, in addition to reducing the production of ROS and consequently apoptosis and cell death. Thus, it is possible to conclude that supplementation with Beta-NGF has a positive effect on the production of in vitro embryos.

Key words: nerve growth factor, cytoplasmic maturation and in vitro embryo production.

4.1 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 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 acelerar o 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) e 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 influenciam diretamente em 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 morfologia 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 *et al.* (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, tornam-se necessários 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.

4.2 OBJETIVO

4.2.1 Objetivo Geral

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

4.2.2 Objetivo específico

- Avaliar por 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.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Vale destacar que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, com parecer N° 106/2022/CEUA/PROPP/REITO

4.3.1 Maturação *in vitro*

4.3.1.1 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.

4.3.1.2 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, eles 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 cúmulus com mais de três camadas.

4.3.1.3 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.

4.3.1.4 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: quantificação de mitocôndrias, 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.

4.3.1.5 Mitocôndrias

Para a quantificação de mitocôndrias foram analisados 11 ovócitos sem suplementação e 7 com suplementação. Os CCOs maturados foram transferidos para microgotas de 200 μ L de solução contendo 2 μ L de MitoTracker Orange M-7510 (554/576) em concentração de 1mM e 2mL de meio de maturação TCM 199 com bicarbonato. 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.

4.3.1.6 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 bicarbonato. 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.

4.3.1.7 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 100µL de solução de iodeto de propídeo (IP) (493/636) diluído em PBS na concentração de 2,0µg/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 100µL 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 20µL de meio de montagem (água destilada, glicerol e Hoescht), cobertos com lamínula e selados com esmalte.

4.3.1.8 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.

4.3.1.9 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.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 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 Ovócito*	19.937	33.216	0,0424
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 ($p \leq 0,05$)

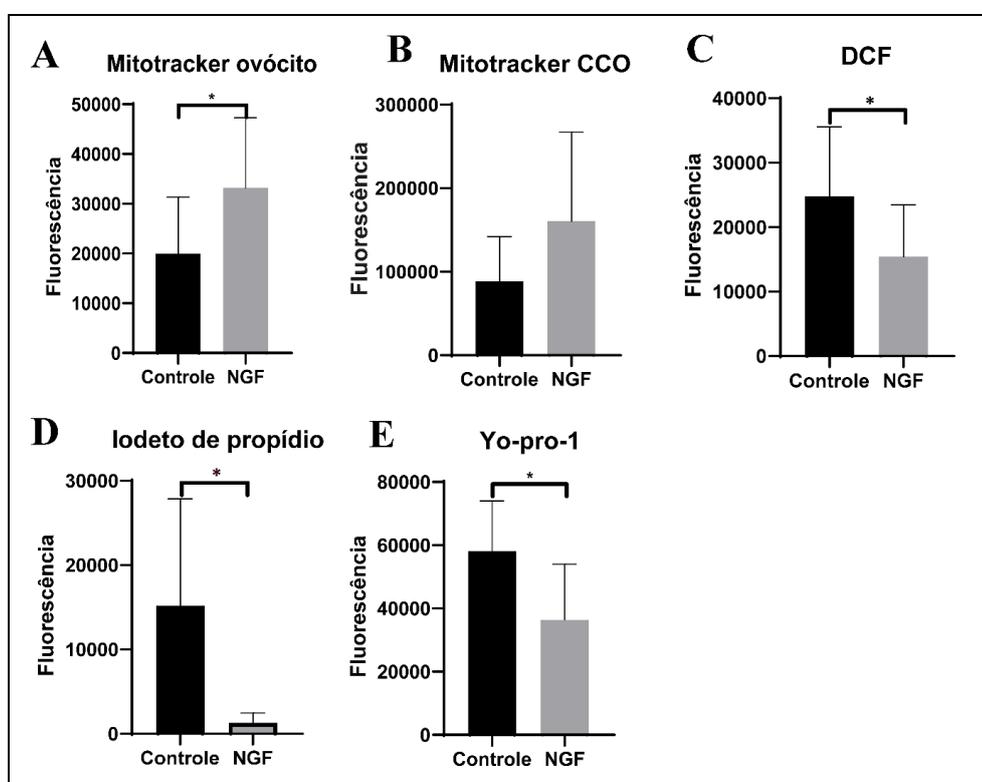


Figura 1 - Análise estatística dos dados obtidos a partir da emissão de fluorescência com diferentes marcadores. Marcação com Mitotracker apenas no ovócito (A).

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 (F). *= diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$)

4.4.2 Mitocôndrias

A fluorescência foi obtida 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.

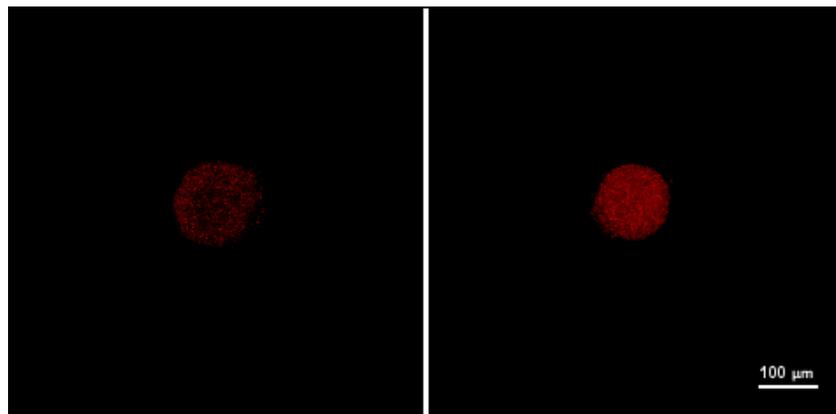


Figura 2 - Ovócitos marcados com Mitotracker com sobreposição de "slices" (2A) sem e (2B) com suplementação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

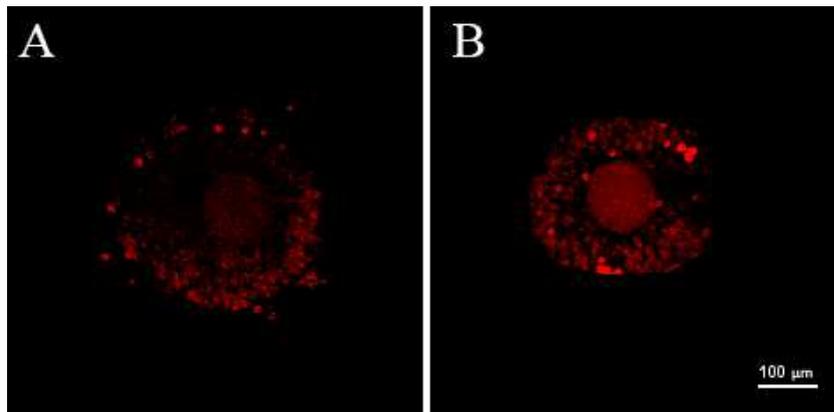


Figura 3 - CCOs marcados com Mitotracker com sobreposição de "slices" (3A) sem suplementação e (3B) com suplementação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.3 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.

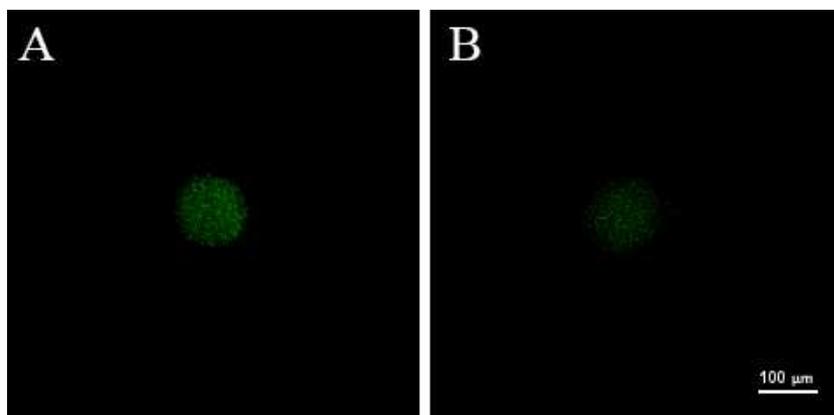


Figura 4 - CCOs marcados com DCF com sobreposição de "slices" (4A) sem e (4B) com suplementação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.4 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 as 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.

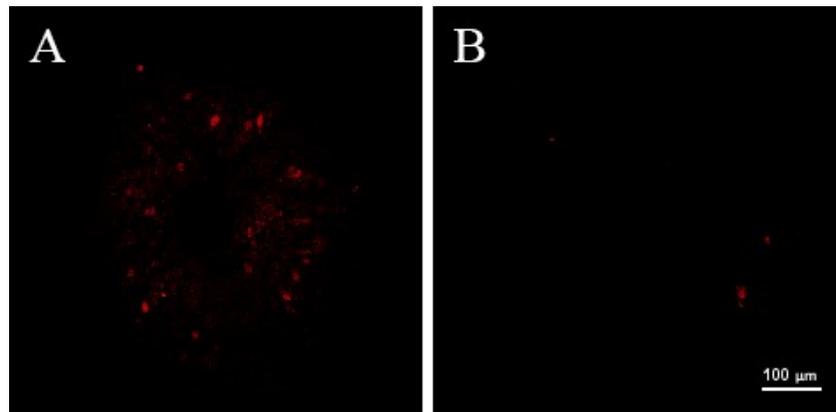


Figura 5 - CCOs marcados com iodeto de propídeo com sobreposição de "slices" (5A) sem e (5B) com suplementação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

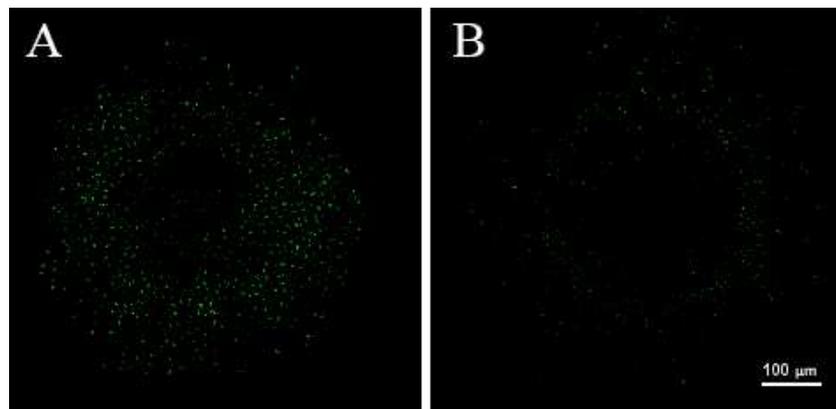


Figura 6 - CCOs marcados com Yo-Pro-1 com sobreposição de "slices" (6A) sem e (6B) com suplementação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 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 ele 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 quantidade de mitocôndria 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 suprafisiológicos, 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 mantêm impermeáveis para o IP. Em ambas as 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.

Sendo assim, a suplementação com Beta-NGF realmente atua no aumento da longevidade devido as possíveis propriedades antioxidantes e diminuição de EROs e apoptose.

4.6 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.

REFERÊNCIAS

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.98, p. 257–265, 1993.

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.

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.

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.

COMPORTI, M. Three models of free radical induced cell injury. **Chem Biol Interact** v.72, p. 1-56, 1989

CREE, L. M.; SAMUELS, D. C.; CHUVA, S.; LOPES, S.; RAJASIMHA, H. K.; WONNAPINIJI, 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.

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.

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.

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.

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.

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.

FAN, H.-Y.; SUN, Q.-Y. Oocyte Meiotic Maturation. *Em: The Ovary***3**. Elsevier, 2019. p. 181–203.

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.

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.

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.

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.

GUERIN, P.; MOUATASSIM, S.E.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, p.175-189, 2001.

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.

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.

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.

PARTHIPAN, S.; SELVARAJU, S.; SOMASHEKAR, L.; ARANGASAMY, A.; SIVARAM, M.; RAVINDRA, J.P. Spermatozoal transcripts expression levels are predictive of semen quality and conception rate in bulls (*Bos taurus*). **Theriogenology**, v. 98, p. 41–9, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.042>.

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.

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.

RICHTER, C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 44, p. 175–189, 1987.

SHOUBRIDGE, E. A.; WAI, T. Mitochondrial DNA and the Mammalian Oocyte. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 77, p. 87–111, 2007.

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.

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.

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.

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.

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.

CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos podemos afirmar que a Beta-NGF é uma alternativa viável na suplementação aos meios de produção *in vitro* de embriões bovinos. A confirmação da presença dos receptores TRK e P75, aliada como os resultados obtidos com a adição de 100ng da proteína no meio de maturação ovocitário, mostram melhora na eficiência de produção.

Dessa forma, pode-se afirmar que além de melhorar a produção de embriões, a qualidade das estruturas também é melhor, visto que as células suplementadas produzem uma maior quantidade de mitocôndrias, conseqüentemente maior produção de ATP, sem o aumento de espécies reativas de oxigênio, com menor apoptose e morte celular.

É notório que ainda precisamos realizar novos trabalhos, principalmente que envolvam a transferência dos embriões suplementados e que avaliem o desempenho até o nascimento, sobretudo por se tratar de uma proteína neurotransmissora. Assim a Beta-NGF pode ser uma opção plausível a ser utilizada nas rotinas de produção comercial de embriões bovinos *in vitro*, a fim de melhorar os índices reprodutivos e conseqüentemente aumentar a produtividade das fazendas.