

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

MATEUS DOMINGUES ELLER TEIXEIRA

**Suplementação com beta-NGF no processo de maturação ovocitária e seu impacto nas
taxas da produção *in vitro* de embriões bovinos**

UBERLÂNDIA-MG

Março/2026

MATEUS DOMINGUES ELLER TEIXEIRA

Suplementação com beta-NGF no processo de maturação ovocitária e seu impacto nas taxas da produção *in vitro* de embriões bovinos

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II.

Área de concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emilio Beletti

UBERLÂNDIA-MG
Março/2026

MATEUS DOMINGUES ELLER TEIXEIRA

Suplementação com beta-NGF no processo de maturação ovocitária e seu impacto nas taxas da produção *in vitro* de embriões bovinos

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II.

Uberlândia, 18 de março de 2026.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti
Universidade Federal de Uberlândia

Dr. Muller Carrara Martins
Veterinário autônomo

Dr. Pedro Sanches Oquendo Júnior
Universidade Federal de Uberlândia

UBERLÂNDIA-MG

Março/2026

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha sincera reverência a Deus, fonte de fortalecimento e orientação que, ao longo desta jornada, me conduziu e amparou, permitindo-me superar cada obstáculo encontrado no curso e na vida.

Agradecer encarecidamente a minha família, principalmente meus pais, que tornou a realização desse trabalho possível e acreditaram no meu potencial, sendo pilares fundamentais que sustentaram minha trajetória.

Aos meus amigos, cujo companheirismo e colaboração foram essenciais para o meu crescimento profissional, envio meu sincero agradecimento.

À Dr. Marcelo Emílio Beletti, meu orientador, expresso minha apreciação pela confiança e apoio, que através dos seus ensinamentos permitiram que eu pudesse hoje estar concluindo este trabalho.

A todos que participaram desta pesquisa, pela disposição e colaboração na obtenção de dados.

RESUMO

A PIVE (produção *in vitro* de embriões) em bovinos no Brasil tem se destacado como uma tecnologia avançada e eficaz no melhoramento genético do rebanho. Esse processo permite a produção de embriões a partir da fertilização de óvulos coletados de vacas geneticamente superiores, que são posteriormente transferidos para outras fêmeas receptoras. Já foi identificada uma correlação positiva entre os níveis de Beta-NGF (fator de crescimento nervoso beta) nos espermatozoides e as taxas de clivagem e desenvolvimento até o blastocisto no processo de PIVE, indicando que esse fator pode desempenhar um papel importante na melhoria da eficiência da técnica. Objetivou-se com o presente trabalho avaliar como a suplementação com 100 ng/mL de Beta-NGF no meio de maturação ovocitária influencia as taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário, de blastocisto e de implantação de embriões na produção *in vitro* de embriões bovinos. Para isso foi utilizado um laboratório comercial que realiza centenas de rotinas de PIVE por ano. Após a concordância dos proprietários, parte das PIVEs de 4 rotinas foi realizada com metade dos ovócitos com meio de maturação ovocitária sem Beta-NGF e metade com 100 ng/ml de beta-NGF. Ao final das rotinas os blastocistos normais foram implantados em vacas receptoras sincronizadas. Os resultados demonstram que a suplementação com beta-NGF resultou em aumentos notáveis na taxa de desenvolvimento embrionário (70,9 vs 55,6) e na taxa de blastocisto (38,6 vs 31,1) quando comparadas ao grupo controle. Já a taxa de concepção apresentou tendência de aumento (52,5 vs 45,3). Por outro lado, a taxa de clivagem permaneceu praticamente estável entre os dois grupos (55,2 vs 55,8). Conclui-se que a suplementação com 100 ng/ml de beta-NGF no meio de maturação ovocitária melhora a eficiência da PIVE, podendo melhorar a taxa de concepção após a transferência dos blastocistos para vacas receptoras.

Palavras-chave: aspiração folicular; fator de crescimento nervoso; transferência de embrião

ABSTRACT

In vitro embryo production (IVEP) in cattle in Brazil has become a prominent and effective technology for genetic improvement of herds. This process allows the production of embryos from the fertilization of oocytes collected from genetically superior cows, which are subsequently transferred to other recipient females. A positive correlation has already been identified between the levels of Beta-NGF (nerve growth factor beta) in spermatozoa and the cleavage and blastocyst development rates in the IVP process, indicating that this factor may play an important role in improving the efficiency of the technique. The objective of this study was to evaluate how supplementation with 100 ng/mL of Beta-NGF in the oocyte maturation medium influences the cleavage, embryonic development, blastocyst, and implantation rates of embryos in the *in vitro* production of bovine embryos. For this purpose, a commercial laboratory that performs hundreds of IVP procedures per year was used. After obtaining the owners' consent, part of the IVF cycles from 4 routines were performed with half of the oocytes using oocyte maturation medium without Beta-NGF and half using 100 ng/ml of Beta-NGF. At the end of the cycles, normal blastocysts were implanted into synchronized recipient cows. The results demonstrate that supplementation with beta-NGF resulted in notable increases in the embryonic development rate (70.9 vs 55.6) and blastocyst rate (38.6 vs 31.1) when compared to the control group. The conception rate showed a tendency to increase (52.5 vs 45.3). On the other hand, the cleavage rate remained practically stable between the two groups (55.2 vs 55.8). It is concluded that supplementation with 100 ng/ml of Beta-NGF in the oocyte maturation medium improves the efficiency of IVP (*in vitro* production), and may improve the conception rate after blastocyst transfer to recipient cows.

Keyword; follicular aspiration; beta nerv grow factor; embryo transfer

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO	11
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1 Produção in vitro de embriões.....	11
3.2 Produção in vitro de embriões usando Beta-NGF na maturação	13
3.3 Transferência de embriões	14
4.METODOLOGIA	15
4.1 Ovócitos e sêmen	15
4.1 Produção in vitro de embriões	15
4.2.1 Maturação in vitro dos ovócitos.....	16
4.2.2. Fertilização In Vitro.....	16
4.2.3. Cultivo In Vitro.....	17
4.3 Envase Do Embrião.....	17
4.4 Transferência De Embrião	17
4.5 Diagnostico De Gestação	18
4.6 Análise dos Dados	18
4.6.1. Análise estatística	19
5. RESULTADOS	19
6. DISCUSSÃO	22
7.CONCLUSÃO.....	24
8.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Gráfico demonstrando as médias e desvios-padrão da taxa de clivagem dos grupos controle e tratado.....	19
Figura 2: Gráfico demonstrando as médias e desvios-padrão da taxa de desenvolvimento embrionário dos grupos controle e tratado.....	19
Figura 3: Gráfico demonstrando as médias e desvios-padrão da taxa de blastocisto dos grupos tratado e controle.....	20
Figura 4: Gráfico demonstrando as médias e desvios-padrão da taxa de concepção dos grupos tratado e o grupo controle.....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias e desvios-padrão das taxas das PIVEs com e sem suplementação com beta-NGF.....	18
---	-----------

1. INTRODUÇÃO

O Brasil destacou-se como o maior rebanho bovino do mundo, além de ser o segundo maior consumidor e exportador de carne bovina no mundo em 2022 (ABIEC, 2022). Para aumentar a eficiência nos sistemas de produção na bovinocultura, o país tem utilizado de recursos biotecnológicos na reprodução. Dentre essas técnicas, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem sido fundamental, permitindo obter um número maior de embriões a partir de vacas de alto potencial genético em menor tempo. Porém, ainda é um processo com custos de produção elevados devido à taxa média de conversão de 30% (MELLO et al., 2016).

Estudos estão sendo realizados para identificar estratégias que reduzam os custos e melhorem a eficiência da aspiração folicular (OPU) e da produção *in vitro* de embriões (PIVE) (SANTOS et al., 2017), otimizando a coleta de ovócitos, a maturação *in vitro* (MIV), a fertilização *in vitro* (FIV), o cultivo *in vitro* (CIV) e a transferência de embriões (TE) (GARCIA et al., 2017). Essas pesquisas focam na função, no desenvolvimento e no metabolismo de gametas e embriões, no uso da ultrassonografia, no desenvolvimento de medicamentos seguros e eficazes, além da criação de novos meios de cultivo, considerados fatores limitantes para o sucesso da técnica (SANTOS et al., 2017).

O beta-NGF (Fator de Crescimento Nervoso beta, do inglês Nerve Growth Factor), frequentemente referido apenas como NGF, é uma proteína sinalizadora da família das neurotrofinas. Embora historicamente conhecido por seu papel vital na sobrevivência, no desenvolvimento e na manutenção de neurônios sensoriais e simpáticos. Pesquisas recentes destacaram seu papel crucial na reprodução (FERRAGUTI et al., 2022). Pesquisas mostraram que o β -NGF presente no plasma seminal é o principal agente indutor de ovulação em camelídeos (como lhama e camelo) após a cópula (RATTO et al., 2023). O β -NGF e seus receptores estão presentes nos ovários, tubas uterinas e útero, participando da foliculogênese (maturação dos óvulos) e esteroidogênese e após a ovulação, o NGF auxilia no desenvolvimento e funcionalidade do corpo lúteo (GAJARDO ET AL., 2023)

Recentemente, o Beta-NGF (Beta-Nerve Growth Factor) tem emergido como um potencial melhorador do desenvolvimento embrionário durante o processo de produção *in vitro* de embriões (PIVE), etapa fundamental para a TE. Estudos têm demonstrado que o Beta-NGF pode desempenhar um papel crucial na maturação dos ovócitos, na melhoria da qualidade do embrião e na redução das taxas de apoptose e de morte celular (MARTINS, 2023). No entanto, este trabalho avaliou apenas, de forma quantitativa e qualitativa, a formação de blastocistos quando o Beta-NGF foi utilizado no processo de maturação ovocitária. O presente trabalho

diferencia-se dos já realizados, pois foi conduzido em laboratório comercial e o desenvolvimento embrionário foi acompanhado por pelo menos 60 dias.

Ao integrar o Beta-NGF no processo de PIVE, é possível melhorar a qualidade dos embriões transferidos, potencializando o sucesso da transferência de embriões. Essa abordagem pode aumentar as taxas de clivagem, melhorar o desenvolvimento embrionário e, consequentemente, as taxas de gestação em receptoras. Além disso, o uso de Beta-NGF pode ampliar a eficiência do melhoramento genético ao permitir a produção de um maior número de embriões de alta qualidade. Assim, a utilização de Beta-NGF como aditivo no cultivo de embriões tem o potencial de transformar a biotecnologia de transferência de embriões em bovinos, trazendo benefícios significativos para a pecuária de precisão. Contudo, neste trabalho verificamos a verdadeira influência na taxa de concepção quando utilizados embriões produzidos por PIVE com Beta-NGF no meio de maturação ovocitária.

2 . OBJETIVO

Com esse estudo objetivou-se avaliar como a suplementação com 100 ng/mL de Beta-NGF no meio de maturação ovocitária influencia as taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário, de blastocisto e de implantação de embriões na produção *in vitro* de embriões bovinos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produção *in vitro* de embriões

Em 2022, o Brasil consolidou sua posição como detentor do maior rebanho bovino do mundo, além de ocupar o segundo lugar tanto no consumo quanto na exportação de carne bovina em escala global (ABIEC, 2022). A técnica de PIVE é de natureza complexa, envolvendo diversas fases, como a coleta de oócitos, sua maturação, fertilização, cultivo e a seleção dos embriões viáveis (LUEDKE et al., 2019). Além disso, ela está associada a uma série de procedimentos que incluem o manejo reprodutivo das doadoras e receptoras, punção folicular guiada por ultrassom ou aspiração folicular, e processos laboratoriais até a transferência dos embriões (RIZOS et al., 2008).

A biotecnologia de punção folicular assistida por ultrassom (OPU), usada para a obtenção de oócitos, começou a ser implementada na década de 1990 (PIETERSE et al., 1991). O estudo realizado por PIETERSE et al. (1991) demonstrou que era possível coletar oócitos imaturos para a PIVE sem a necessidade de procedimentos invasivos, como a laparoscopia. Além de ser uma técnica menos agressiva, ela oferecia uma alternativa à superovulação e coleta de embriões *in vivo*, permitindo ainda a aspiração de fêmeas jovens e, assim, reduzindo o intervalo entre gerações (JAINUDEEN; WAHID E HAFEZ, 2004). Desde então, a OPU tem sido continuamente estudada e aprimorada para alcançar resultados cada vez melhores, tanto na quantidade quanto na qualidade dos oócitos coletados (SENEDA et al., 2020).

Após a aspiração folicular assistida por ultrassom, realiza-se a análise e a seleção dos oócitos. Eles são categorizados em quatro graus com base na presença de células do cumulus e nas características do ooplasma. O grau I é considerado o estágio mais avançado, enquanto o grau IV indica oócitos sem células do cumulus (LEAL, 2008). Os oócitos classificados nos graus I, II e III são os escolhidos para a PIVE (PETRY et al., 2019).

Os oócitos são transportados para o laboratório, onde são cuidadosamente armazenados em uma temperatura de 38,5 °C, com uma atmosfera contendo 5% de CO₂ e umidade de 95%, iniciando assim o processo de maturação *in vitro* (PETRY et al., 2019; BARROZO et al., 2022). A maturação *in vitro* (MIV) é um passo crucial para tornar o oócito apto à fecundação, e ocorre ao longo de 22 a 24 horas (BARROZO et al., 2022). Diversos estudos continuam sendo realizados para otimizar essa fase, uma vez que envolve transformações significativas nas células, impactando diretamente o sucesso da PIVE (LUEDKE et al., 2019). SPECKHART et al. (2023) destacam a relevância de controlar a temperatura durante todo o processo, sendo 38,5°C a temperatura ideal, assim como a preparação adequada dos meios, garantindo que o processo aconteça no tempo correto e preservando a qualidade dos oócitos.

Na fecundação *in vitro* (FIV), são utilizados espermatozoides provenientes de sêmen congelado, que são previamente selecionados por meio da separação com o gradiente Percoll e capacitados pela adição de heparina e glicosaminoglicanas no meio de fecundação (VARAGO et al., 2008). É essencial que todo o processo ocorra de forma coordenada com a manipulação dos oócitos, seguindo um protocolo rigoroso, para garantir que ambos, oócitos e espermatozoides, sejam tratados no tempo adequado, minimizando variações de temperatura e exposição desnecessária ao ambiente, o que poderia prejudicar os resultados (SPECKHART et

al., 2023). O sêmen é então colocado em uma placa juntamente com os oócitos para que a fecundação aconteça (GONÇALVES; FIGUEIREDO E FREITAS, 2002).

Após a fecundação, que ocorre entre 22 e 24 horas, realiza-se o desnudamento, processo no qual as células do cumulus são removidas sem danificar a zona pelúcida. Isso é feito por pipetagem contínua, utilizando força e velocidade adequadas (SPECKHART et al., 2023). Em seguida, os zigotos são transferidos para uma placa contendo um meio específico, que favorece seu desenvolvimento até atingir o estágio de blastocisto. Esse procedimento é chamado de cultivo *in vitro* (CIV), momento em que o genoma embrionário é ativado, e ocorrem a clivagem e a diferenciação (BARROZO et al., 2022). Todas as etapas de maturação, fertilização e cultivo são realizadas em condições controladas dentro de uma estufa, com temperatura de 38,5°C, 5% de CO₂ e umidade ajustada (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2002). Cada fase requer o uso de meios específicos para o processo (SPECKHART et al., 2023).

O desenvolvimento embrionário é monitorado no 6º dia, quando se avalia a taxa de formação de blastocistos em relação ao número de oócitos selecionados, além da compactação dos blastômeros e a formação inicial da blastocela (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2002; BARROZO et al., 2022). No 7º dia, realiza-se a classificação morfológica, e a partir disso, são escolhidos os embriões adequados para a transferência ou criopreservação (OLIVEIRA; SERAPIÃO; QUINTÃO, 2014; BARROZO et al., 2022).

Segundo Oliveira et al. (2014), a criopreservação de embriões é um procedimento desafiador, pois esses embriões possuem aproximadamente 90 células envoltas pela zona pelúcida, e danos ou a perda dessas células podem ser irreversíveis. A criopreservação pode ser realizada por meio do congelamento lento tradicional ou por vitrificação (DODE; LEME; SPRÍCIGO, 2013).

Grázia (2019) destaca que a PIVE oferece várias vantagens para a bovinocultura, mas também envolve diversas variáveis que impactam os resultados, como diferentes protocolos laboratoriais, fatores do campo, qualidade dos oócitos e aspectos relacionados à receptora. Essas variáveis influenciam diretamente nas taxas de gestação, perdas gestacionais e nascimentos, indicando a necessidade de mais pesquisas nessas áreas.

3.2 Produção *in vitro* de embriões usando Beta-NGF na maturação

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma técnica amplamente utilizada na reprodução assistida de diversos animais, incluindo em contextos de melhoramento genético e preservação de espécies. O processo envolve a coleta de óvulos de fêmeas, que são posteriormente maturados, fertilizados e cultivados até o estágio de embrião. Uma das etapas críticas para o sucesso da PIVE é a maturação *in vitro* dos oócitos, onde substâncias como fatores de crescimento desempenham um papel fundamental. Entre esses fatores, o Beta-NGF (Bovine Neurotrophic Growth Factor) tem ganhado destaque nas pesquisas relacionadas à maturação oocitária, especialmente em bovinos. O Beta-NGF é uma proteína que, originalmente, está associada ao desenvolvimento e à função do sistema nervoso, mas estudos têm mostrado que ele também tem efeitos benéficos na maturação de oócitos ARLE (2019). A suplementação de Beta-NGF nas etapas iniciais do cultivo embrionário favorece a atividade mitocondrial, aumentando a produção de ATP sem elevar as espécies reativas de oxigênio o que aumentou significativamente as taxas de fertilização e formação de blastocistos (NAGANO; KATAGIRI; TAKAHASHI, 1994; STOJKOVIC et al., 2001). Além disso, O ATP é essencial para a maturação nuclear e citoplasmática (DURAN et al., 2011; NAGANO; KATAGIRI; TAKAHASHI, 1994). Pois é necessário para a atividade das proteínas motoras envolvidas na divisão celular. Durante a maturação, a quantidade de DNA mitocondrial (mtDNA) nos ovócitos aumenta de 6 para 100 mil (FERREIRA et al., 2009), o que pode ser um mecanismo para garantir energia suficiente até a implantação, uma vez que o mtDNA não se replica nas fases iniciais da clivagem (SHOUBRIDGE; WAI, 2007). Outra teoria sugere que essa ampliação ajuda a reduzir mutações no mtDNA (CREE et al., 2008), o que resulta em embriões mais viáveis e com maior potencial de desenvolvimento até o blastocisto. Esses achados são consistentes com a pesquisa de ARLE (2019), que mostrou que a suplementação com Beta-NGF melhora a eficiência da PIVE em bovinos. Sua utilização tem se mostrado promissora no aprimoramento da qualidade do oócito e, conseqüentemente, no aumento das taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário MARTINS (2023). Dentre os efeitos do Beta-NGF estão a regulação da maturação, melhora das taxas de fertilização e ação antioxidante. O uso de Beta-NGF na maturação *in vitro* de oócitos representa um avanço importante na produção de embriões de alta qualidade. Além disso, sua utilização pode otimizar os processos de produção de embriões em larga escala, proporcionando maior eficiência e menores custos. No entanto, a aplicação de Beta-NGF ainda exige mais estudos para avaliar

sua eficácia sob condições variáveis de cultivo e nas transferências de embriões *in vivo*, principalmente sua influência na taxa de prenhez das vacas receptoras.

3.3 Transferência de embriões

A transferência de embriões (TE) foi realizada com sucesso, é fundamental que a receptora estivesse em condições adequadas para a reprodução, ou seja, que seu sistema reprodutivo esteja livre de doenças ou infecções, que seu ciclo estral seja regular e que ela apresente um bom escore corporal. Além disso, foi essencial que a receptora esteja sincronizada com o embrião, com uma diferença de até 24 horas entre o momento da fertilização do embrião e o cio da receptora, podendo ser até 24 horas antes ou depois. A receptora também deve ter um corpo lúteo (CL) funcional, o que é crucial para que a gestação se desenvolva corretamente ao receber o embrião (JAINUDEEN; WAHID E HAFEZ, 2004).

O procedimento foi feito com rigorosa assepsia e aplicação de anestesia epidural (lidocaína 2%). O aplicador foi inserido pela vagina, atravessa o cérvix e o embrião é colocado no final do corno uterino do lado correspondente ao ovário com CL. Foi de extrema importância que esse procedimento fosse realizado por profissionais qualificados, para evitar danos ao sistema reprodutivo e garantir o depósito correto do embrião (JAINUDEEN; WAHID E HAFEZ, 2004).

4. METODOLOGIA

4.1. ovócitos e sêmen

Os ovócitos foram obtidos por meio da aspiração folicular de doadoras de fazendas parceiras dos laboratórios. Por meio de ultrassom, foram identificados os folículos apropriados para aspiração e, então, realizaram-se a aspiração e a seleção dos ovócitos de doadoras por profissionais especializados. Foram empregados sêmen preservado em nitrogênio líquido de vários touros reprodutores de uma central especializada, com comprovada fertilidade para produção *in vitro*, já utilizados em processos de PIVE.

4.2. Produção *in vitro* de embriões

Em todas as etapas da PIVE foram utilizados meios adquiridos da empresa Origem de Uberaba, MG,

4.2.1 Maturação *in vitro*

Após o processo de aspiração folicular, os ovócitos foram selecionados de acordo com sua qualidade e lavados uma vez em meio de lavagem TCM-199 HEPES, colocados em um meio de cultivo específico em tubos de 5ml contendo o meio de maturação (amostras individuais para cada animal dependendo da produção de ovócitos), que simula as condições do trato reprodutivo feminino. Foram selecionados apenas ovócitos (CCOs) graus 1, 2 e 3 (STOJKOVIC et al., 2001). Este meio contém nutrientes e hormônios necessários para o desenvolvimento e a maturação dos ovócitos, tais como piruvato sódico, HEPES, bicarbonato de sódio, amicacina e 10% de soro fetal bovino. Em seguida, foram lavados novamente em meio de maturação TCM-199 com bicarbonato, contendo piruvato sódico, bicarbonato de sódio, amicacina, FSH, LH e 10% de soro fetal bovino. A maturação ocorreu em condições ambientais específicas, com temperatura controlada em 38,5 °C e umidade saturada, além de pH adequado, frequentemente em incubadoras com atmosfera enriquecida com dióxido de carbono, mantendo nível de 5% de CO₂. Durante este processo, os ovócitos passaram por uma série de modificações celulares que as prepararam para a fertilização. A maturação dos ovócitos *in vitro* dura entre 22 a 24 horas. Durante esse período, o ovócito se desenvolve e completa a meiose, processo fundamental para que esteja pronto para ser fertilizado. Na maturação, houve dois grupos: o controle, sem o uso de Beta-NGF, e o tratado, realizado com 100 ng de Beta-NGF no meio de maturação dos ovócitos, conforme indicado por MARTINS (2023).

4.2.2. Fertilização *in vitro*

Após a maturação, os oócitos eram lavados três vezes em microgotas de meio Talp-fert, com suplementos específicos, e transferidos para novas gotas de meio Talp-fert cobertas com óleo mineral. O sêmen era descongelado e depositado sobre um gradiente de Percoll, composto por duas camadas de soluções de Percoll 45% e 90%. Após centrifugação a 900xg por 30 minutos, 30 µL do sedimento formado eram transferidos para um tubo com meio Talp-fert para

corrigir a concentração e capacitar os espermatozoides. A motilidade e a concentração espermática foram avaliadas, e a contagem foi realizada na câmara de Neubauer. A concentração dos espermatozoides foi ajustada para 100.000 espermatozoides por gota de 100 μL , sendo adicionados 4 μL da mistura a cada gota da placa de FIV, resultando em 5.000 espermatozoides por oócito.

4.2.3. Cultivo *in vitro*

Os zigotos foram desnudados mecanicamente por pipetações sucessivas e lavados três vezes com gotas de 100 μL de meio SOF, contendo piruvato sódico, BSA, soro fetal bovino e amicacina. Depois, foram transferidos para gotas de meio SOF cobertas com óleo mineral, em placas de poliestireno, para cultivo por 6 dias. A taxa de clivagem foi avaliada 48 horas após a fecundação, contando os embriões com duas ou mais células. A taxa de blastocisto foi determinada no sétimo dia, calculada em relação ao número de embriões que chegaram a esse estágio. Para avaliar a taxa de blastocisto, foi considerada a conversão do ovócito imaturo em blastocisto, diferenciando-se da taxa de evolução embrionária, que considera apenas os ovócitos que iniciaram a clivagem e converteram-se em blastocisto.

4.3. Envase dos embriões

Após a formação dos blastocistos, os embriões foram envasados em palhetas de 0,25ml no meio SOF de transferência de embriões e foram transportados do laboratório até a fazenda por meio de uma incubadora portátil que mantém os embriões em temperatura de 37°C.

4.4. Transferência de embriões

Os embriões produzidos foram selecionados e envasados no laboratório, e a retirada e o transporte foram realizados na incubadora portátil. Os embriões foram levados para o campo para transferência em receptoras *in vivo*, as quais já haviam sido induzidas por meio de um

protocolo hormonal para sincronizar a ovulação e promover a produção *in vitro* de embriões e a transferência nas receptoras aptas a recebê-los.

4.5. Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado aos 30 e 60 dias após a transferência, com o objetivo de avaliar possíveis diferenças nas taxas de concepção entre os dois grupos.

4.6 Análise dos Dados

A análise de dados deste estudo foi direcionada à avaliação do impacto da suplementação do meio de maturação de ovócitos com 100 ng/ml de Beta-NGF sobre os desfechos reprodutivos de embriões produzidos *in vitro*. Para isso, foram aproveitadas rotinas de um laboratório comercial com ampla experiência em PIVEs, sendo selecionadas 4 rotinas, nas quais os ovócitos foram distribuídos em dois grupos experimentais: um cultivado em meio convencional (controle) e outro em meio acrescido de Beta-NGF (tratado). Nestas quatro rotinas, foram utilizados 969 complexos cúmulo-oóforos (CCOs), graus 1, 2 e 3 (STOJKOVIC et al., 2001), sendo produzidos 356 blastocistos, dos quais 146 foram transferidos para vacas receptoras.

Após a produção embrionária, os blastocistos morfolologicamente viáveis foram transferidos para vacas receptoras previamente sincronizadas, e o diagnóstico de gestação foi realizado aos 30 e 60 dias após a transferência. As variáveis analisadas incluíram as taxas de clivagem (fertilização), de desenvolvimento embrionário, de blastocisto e de concepção após transferência em tempo fixo (TETF). O cálculo dessas taxas foi realizado da seguinte forma: a taxa de clivagem é igual ao número de estruturas clivadas 72 h após a FIV dividido pelo número de CCOs submetidos à maturação; a taxa de desenvolvimento embrionário, calculada 7 dias após a fertilização, é igual ao número de blastocistos dividido pelo número de clivados; e a taxa de blastocisto igual ao número de blastocistos dividido pelo número de CCOs submetidos à maturação. A taxa de concepção é a porcentagem de vacas receptoras que tiveram a gestação confirmada após 60 dias da transferência.

4.6.1. Análise estatística

Considerou-se a existência de apenas dois grupos: controle (sem beta-NGF) e tratado (com beta-NGF). Para a análise estatística, utilizou-se o teste t pareado, considerando a diferença entre os grupos em cada rotina, para cada uma das taxas avaliadas.

5. RESULTADOS

As médias e desvios-padrão das taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário, de blastocisto e de concepção das rotinas de PIVE estão demonstrados na tabela 1

Tabela 1: Médias e desvios-padrão das taxas das rotinas de PIVE com e sem suplementação com beta-NGF

	Com beta-NGF	Sem beta-NGF
Taxa de clivagem	55,2±11,5	55,8±5,9
Taxa de desenvolvimento embrionário **	70,9±6,7	55,6±4,8
Taxa de blastocisto**	38,6±5,7	31,1±5,0
Taxa de concepção*	52,5±7,7	45,3±3,2

** indica $p < 0,05$; * indica $0,10 < p < 0,05$ Fonte: Próprio autor

Os dados demonstram que a suplementação com 100 ng/mL de beta-NGF resultou em aumentos notáveis na taxa de desenvolvimento embrionário (70,9 vs 55,6) e na taxa de blastocisto (38,6 vs 31,1) quando comparadas ao grupo controle. Já a taxa de concepção apresentou tendência de aumento (52,5 vs 45,3). Por outro lado, a taxa de clivagem permaneceu praticamente estável entre os dois grupos (55,2 vs 55,8).

Estes resultados também estão demonstrados nas figuras 1 a 4

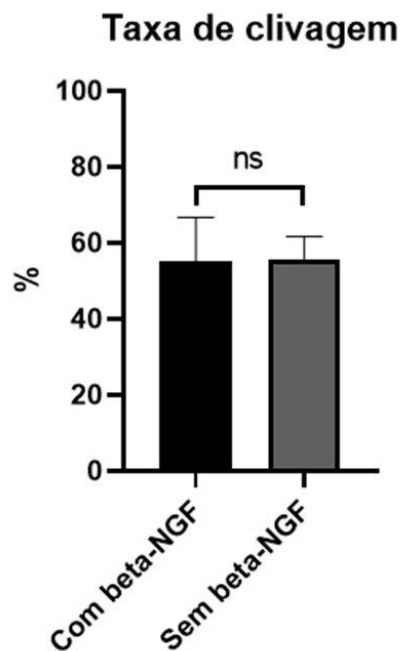


Figura 1: Gráfico demonstrando as médias e desvios-padrão da taxa de clivagem dos grupos controle e tratado (**ns** indica não existir diferença estatística entre os grupos, $p>0,10$)

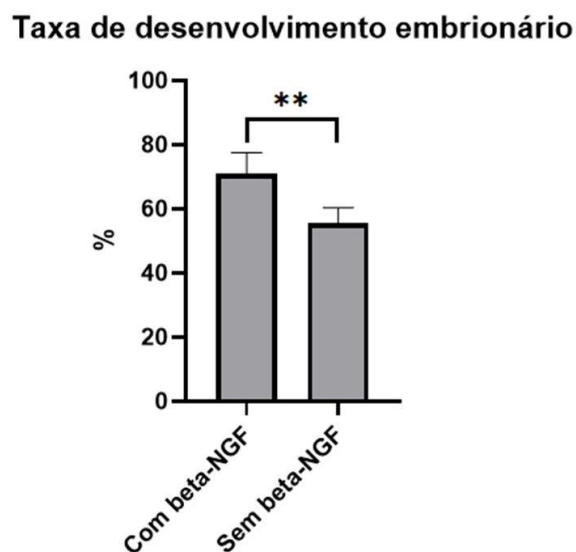


Figura 2: Gráfico demonstrando as médias e desvios-padrão da taxa de desenvolvimento embrionário dos grupos controle e tratado (**: indica diferença estatística entre os grupos, $p<0,05$)

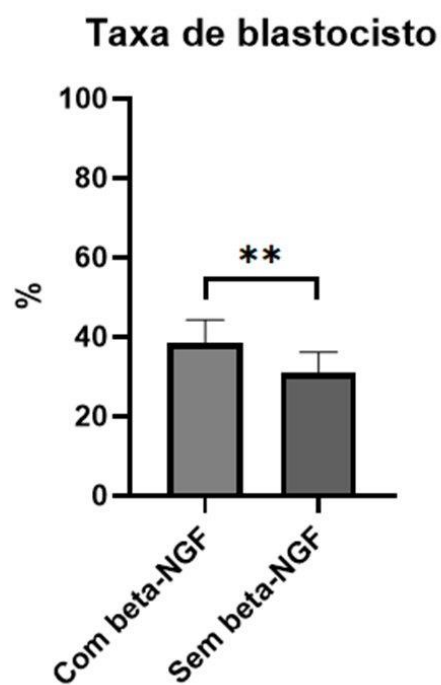


Figura 3: Gráfico demonstrando as médias e desvios-padrão da taxa de blastocisto dos grupos tratado e controle (**: indica diferença estatística entre os grupos, $p < 0,05$)

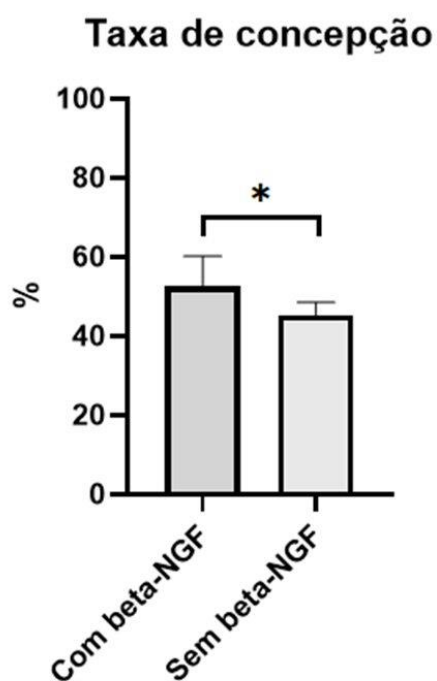


Figura 4: Gráfico demonstrando as médias e desvios-padrão da taxa de concepção dos grupos tratado e o grupo controle (*: indica tendência a existir diferença estatística entre os grupos, $0,10 < p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Com o aumento da intensificação nos sistemas de produção animal, especialmente na bovinocultura brasileira, a competitividade de embriões e prenhezes no mercado nacional e internacional tem gerado uma demanda crescente por métodos de produção mais eficientes e sustentáveis. Nesse contexto, o melhoramento genético animal, com foco em atributos intimamente relacionados à qualidade embrionária, deve ser direcionado para atender às exigências do mercado. Além disso, é necessário otimizar o ganho genético de rebanhos no geral, que atualmente dependem dos métodos de produção *in vitro* de embriões.

Este trabalho apresenta um caráter inovador ao analisar a suplementação com Beta-NGF nos meios de produção *in vitro* de embriões bovinos e seu impacto direto nas taxas de concepção. A definição de concentrações adequadas é determinante para o sucesso do procedimento, como evidenciado no estudo de Martins (2023); o uso de volumes excessivos não garante, necessariamente, o aprimoramento do processo. No presente trabalho foi utilizada a suplementação de beta-NGF na dose de 100 ng/mL, pois foi a dosagem com melhores resultados no trabalho de Martins (2023). Faz-se necessário novos trabalhos avaliando outras concentrações, diferentes das testadas por Martins (2023)

A taxa de clivagem está relacionada à fecundação do oócito, mas não de forma absoluta, já que apesar de raro, é possível um oócito iniciar a clivagem sem ter sido fecundado. De qualquer forma, este é um bom parâmetro para avaliar o processo de fecundação dos ovócitos (Silva et al., 2025). Os resultados do presente trabalho demonstraram que o uso de suplementação na dosagem de 100 ng/mL de beta-NGF no meio de maturação ovocitária não influenciou a taxa de clivagem. Portanto, não interferiu positivamente ou negativamente no processo de fecundação.

A taxa de desenvolvimento embrionário leva em consideração apenas os ovócitos que iniciaram o desenvolvimento embrionário e chegaram a blastocisto, não sofrendo influência do processo de fecundação. Ficou evidente que a suplementação com beta-NGF favoreceu o desenvolvimento embrionário. Esse achado é semelhante ao encontrado por Martins (2023). Lopes (2022) e Martins (2023) demonstraram que a suplementação na dose correta de beta-NGF no meio de maturação ovocitária, aumenta a quantidade e a atividade das mitocôndrias e, consequentemente, de ATP, sem que haja aumento de espécies reativas de oxigênio, levando a uma menor taxa de apoptose e morte celular das células do cúmulo e dos ovócitos.

A taxa de blastocisto leva em consideração os oócitos imaturos que se tornam blastocistos, sofrendo influência da fecundação e do desenvolvimento embrionário. No presente

trabalho, foi evidenciado uma melhoria na taxa de blastocisto, principalmente devido ao melhor desenvolvimento embrionário

LIMA et al. (2020) relatou que a elevação do Beta-NGF estimula a liberação de LH, fator que pode otimizar a eficiência de conversão. Todavia, MATIOLLI et al. (1999) observaram que a ativação do NGF requer também um aumento de LH e FSH; portanto, é possível que a escassez desses hormônios durante o cultivo embrionário possa limitar o crescimento dos zigotos. No entanto, no presente trabalho houve maior taxa de desenvolvimento embrionário e de blastocisto quando o meio foi suplementado com beta-NGF, pois os meios utilizados possuem LH e FSH. LIMA et al. (2020) constataram que a suplementação no cultivo de células ovarianas elevou a produção estrogênica e de testosterona, sem observar, contudo, aumento de progesterona e estradiol, o que demonstra a interação do NGF com as células da teca e da granulosa. No presente trabalho existiam apenas células do cúmulo, que são células granulosas ao redor do oócito.

De acordo com SAEEDNIA et al. (2016) e PARTHIPAN et al. (2017), a suplementação de beta-NGF em meios de criopreservação de sêmen não comprometeu a morfologia celular. O mesmo fenômeno foi observado nos ovócitos, em que a suplementação com beta-NGF não no meio de maturação não alterou a morfologia celular, que preservam sua integridade morfológica e apresentam uma melhoria na taxa de conversão de zigotos em blastocistos. Tais achados evidenciam que os benefícios da suplementação durante a maturação ovocitária não são restritos a essa fase, estendendo-se por todo o desenvolvimento embrionário inicial.

A suplementação do meio de maturação com a referida proteína pode otimizar tanto a quantidade quanto a qualidade embrionária. Embora as análises atuais possuam caráter descritivo, já foi observado um crescimento acelerado nas estruturas suplementadas, as quais atingem estágios de desenvolvimento mais avançados em comparação às células não tratadas. Essa característica pode, inclusive, favorecer a obtenção de resultados superiores após a transferência desses embriões para as receptoras (MARTINS, 2023). Nossos resultados demonstraram uma tendência ao aumento da taxa de concepção quando realizada a suplementação de beta-NGF no meio de maturação ovocitária das PIVEs. Considerando os achados literários e o pequeno número de rotinas (quatro) de PIVE do presente trabalho, acredita-se que uma ampliação deste número poderia conferir significância estatística à taxa de concepção.

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que a suplementação com 100 ng/ml de Beta-NGF no meio de maturação ovocitária melhora a eficiência da PIVE, podendo melhorar a taxa de concepção após a transferência dos blastocistos para vacas receptoras.

Portanto, a manipulação dos níveis desta proteína no laboratório comercial provou ser uma estratégia promissora para aprimorar a pecuária, entregando maior eficiência reprodutiva e viabilizando o uso de animais de alto valor genético com melhores taxas de retorno gestacional.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC. **Beef Report**: Perfil da pecuária no Brasil. Associação Brasileira das Indústrias Exportação de carne. 2022.

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.

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>.

BARROZO, E. L. S. et al. Produção de embriões *in vitro* com sêmen sexado de touros nelore. **Revista Agraria Academica**, v. 5, n. 3, p. 49-58, maio 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.32406/v5n3/2022/49-58/agrariacad>. Acesso em: 22 de fevereiro 2025.

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

DODE, M.A.N.; LEME, L. O.; SPRÍCIGO, J.F.W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.37, n.2, p.145-150, abr./jun. 2013.

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.

FERRAGUTI, G., FANFARILLO, F., TARANI, L., BLACONÀ, G., TARANI, F., BARBATO, C., MINNI, A., RALLI, M., FRANCATI, S., GRECO, A., PETRELLA, C., & FIORE, M. (2022). NGF and the Male Reproductive System: Potential Clinical Applications in Infertility. **International Journal of Molecular Sciences**, 23(21), 13127. <https://doi.org/10.3390/ijms232113127>

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.

GAJARDO, G., PAIVA, L., ULLOA-LEAL, C., VALDERRAMA, X., LÓPEZ, G., CARRASCO, A., HIDALGO, A. I., SILVA, M. E., PALMA, P. I., & RATTO, M. H. (2023). Administration of Beta-Nerve Growth Factor during the Preovulatory Stage Improves Endocrine and Luteal Function in Dairy Heifers. **Animals**, 13(6), 1004. <https://doi.org/10.3390/ani13061004>

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 13 de folículos antrais em vacas da raça Girolando. **Revista Acadêmica Ciência Rural**, v. 15 (supl.), p. 67, 2017.

GRÁZIA, J. G. V. **Produção *in vitro* de embriões (pive) na bovinocultura de leite e de corte**. 2019. 163 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência Animal, Reprodução Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 1.ed. São Paulo, Brasil: Varela, 340p, 2002.

JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. S. E.. Indução da Ovulação, Produção e Transferência de Embriões. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B.. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. Cap. 29. p. 409-434.

LEAL, L. S. **Estudo morfofisiométrico de ovários e maturação ovocitária *in vitro* em bubalinos e bovinos nas diferentes fases da atividade reprodutiva**. 2008. 178 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2008.

LIMA,F.S. STEWARTD, 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

LOPES, M. J. A. **Efeito da suplementação de beta-NGF no meio de maturação ovocitária *in vitro* sobre a estrutura citoplasmática do ovócito bovino**. 2022. 25f. Monografia (TCC – Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2023.

LUEDKE, F. E. et al. Aspectos da produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil– revisão. **Pesquisa agropecuária gaúcha**, v. 25, n. 1/2, p. 120-132, 2019. Disponível em: <http://revistapag.agricultura.rs.gov.br/ojs/index.php/revistapag/article/view/41/32>. Acesso em: 20 fev. 2025.

MARTINS, M. C. **Avaliação da suplementação do meio de maturação *in vitro* de ovócitos bovinos com beta-NGF**. 2023. 78f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2023.

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.; SERAPIÃO, R.V.; QUINTÃO, C.C.R. Biotécnicas da reprodução em bovinos: minicursos ministrados durante o 3o Simpósio “Biotécnicas da Reprodução em Bovinos” no Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica – Juiz de Fora: **Embrapa Gado de Leite**, 52 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 175). 2014.

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>.

PETRY, J. C. et al. **Boletim Técnico 52**: aspiração folicular ovariana e classificação de oócitos bovinos. Descalvado, Sp: Produção Animal Universidade Brasil, 2019. Disponível em: https://universidadebrasil.edu.br/portal/_biblioteca/uploads/20210414205046.pdf. Acesso em: 15 fev. 2025.

PIETERSE, M.C. et al. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 35, n. 4, p. 857-862, abr. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0093-691x\(91\)90426-e](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691x(91)90426-e). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X9190426E?via%3Dihub>. Acesso em: 07 fev. 2025.

RATTO, M. H., PAIVA, L., CARRASCO, R., SILVA, M. E., ULLOA-LEAL, C., RATTO, V. F., & GOICOCHEA, J. (2023). Review: Unveiling the effect of beta-nerve growth factor on the reproductive function in llamas and cows. **Animal**, 17(Suppl 1), 100754. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100754>

RIZOS, D. et al. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 43, Suppl. 4, p. 44-50, 2008.

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, 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.

SENEDA, M. M. et al. Follicular wave synchronization prior to ovum pickup. **Theriogenology**, v. 150, p. 180-185, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.024>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X20300303?via%3Dihub>. Acesso em: 01 jun. 2023.

SILVA, M. V; ROCHA, L. O; TRAVENÇOLO, B. A. N; GUIMARÃES, E. C; BELETTI, M. E. Methods Used to Assess Bull Sperm Chromatin Integrity and Its Correlation with In Vitro Embryo Production Efficiency. **Veterinary Sciences**, v. 12, n. 2, art. 184, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci12020184>

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

SPECKHART, S. L. et al. An updated protocol for *in vitro* bovine embryo production. **Star Protocols**, v. 4, n. 1, p. 101924, mar. 2023. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101924>. Acesso em: 22 de maio 2023.

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.

VARAGO, F. C. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, p. 100-109, abr. 2008. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB152%20Varago%20pag100-109.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2025.