

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ISABELLA OLIVEIRA SILVA CARNEIRO

**CITOTOXICIDADE DA SUPLEMENTAÇÃO DE β -NGF NO MEIO DE
MATURAÇÃO OVOCITÁRIA DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
BOVINOS.**

UBERLÂNDIA

2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ISABELLA OLIVEIRA SILVA CARNEIRO

**CITOTOXICIDADE DA SUPLEMENTAÇÃO DE β -NGF NO MEIO DE
MATURAÇÃO OVOCITÁRIA DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
BOVINOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti
Coorientador: Dra. Elusca Helena Muniz

UBERLÂNDIA

2026

**CITOTOXICIDADE DA SUPLEMENTAÇÃO DE β -NGF NO MEIO DE
MATURAÇÃO OVOCITÁRIA DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
BOVINOS**

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

Uberlândia, 18 de março de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Muller Carrara Martins – Doutorado (FMVZ-UFU)

Prof. Dr. Pedro Sanches Oquendo Junior (FMVZ-UFU)

Dedico esse trabalho aos meus pais que, com os corações mais bonitos que conheço, me deram a virtude de tê-los como melhores amigos desde o meu primeiro respirar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me proporcionar tantas oportunidades incríveis e dentre elas a de concluir a graduação, sempre amparando a mim e todos ao meu lado, agradeço pela saúde, por todas as conquistas, pelos ensinamentos e pelas pessoas que pude conhecer nesse caminho.

Agradeço as agências de fomento à pesquisa FAPEMIG (processo APQ-01881-22) e CNPq (processos 406869/2023-5 e 306482/2022-3) pelo apoio financeiro.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, que me orientou durante todo o trabalho com muita paciência e me ensinou muito sobre a PIVE, sobre diversos outros assuntos do âmbito científico e também nos orienta sobre princípios e caráter sempre, agradeço por ter me apresentado a Pesquisa e mostrar que por mais difícil que seja sempre tem um jeito, tenho grande respeito e admiração pelo profissional incrível e de princípios que é.

Agradeço à Luisa Miglio que me apresentou ao mundo da PIVE com muita paciência e me ensinou com maestria todos os procedimentos necessários para realizar esse trabalho, sempre deixando tudo mais divertido e que me fez gostar tanto dessa área.

Agradeço a minha coorientadora Elusca Muniz que me apoiou tanto durante todo o tempo em que estive no laboratório, desde a IC até atualmente, sempre demonstrando que no laboratório tudo pode ser um trabalho para duas pessoas, deixando o ambiente leve e divertido.

Agradeço a todos os integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Biologia da Reprodução: Alice, Victor, Amanda, Lucas, Ana Laura, Luisa, Mateus, Nayara, com quem tive a oportunidade de dividir risadas, histórias e diversos conhecimentos, agradeço por terem deixado todo o trabalho mais leve e por terem me auxiliado na execução de todo o trabalho de alguma forma.

Agradeço a todos os meus amigos e colegas que a UFU me deu, em especial: Giovana, Naylê, Mariana, Isabella Almeida e Isabella Lucindo.

Agradeço a toda a minha família mas em especial ao meu avô Gilmário que sempre demonstrou tanta empolgação pela minha graduação e sei que hoje do céu me assiste e vibra comigo a cada vitória.

Agradeço ao meu namorado Vinicius, que me apoia sempre em todos os momentos que preciso, sempre trazendo calma para tudo, estando ao meu lado em todos os momentos e com quem compartilho meus fardos e sei que me ajuda a carregar.

Agradeço eternamente aos meus pais Karina e Flávio que me deram a oportunidade de

viver tudo isso, sempre me deram apoio, me ensinaram resiliência e paciência e que me acolhem sempre que preciso e que acima de tudo sempre estão ao meu lado e me ensinam todos os dias a ser uma pessoa melhor.

Agradeço aos meus irmãos Giovanna e João Pedro que são meu porto seguro, meus companheiros de vida e que deixam minha vida leve e divertida sempre, que sempre estão aqui para me dar força e apoio, agradeço a união e o companheirismo sempre.

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) já vem sendo uma técnica muito utilizada no Brasil aplicada à reprodução animal, apresentando destaque na evolução da eficiência na bovinocultura. Contudo, essa biotecnologia ainda possui baixa eficiência no aproveitamento de ovócitos e, portanto, precisa ser melhorada. Já existem trabalhos que verificaram efeitos positivos da suplementação de 100ng/ml da proteína β -NGF ao meio de maturação ovocitária *in vitro* (MIV). Porém, por outro lado, existem trabalhos que demonstram possíveis efeitos citotóxicos na suplementação de 500 ng/ml de proteína β -NGF no mesmo meio. Portanto, ainda se faz necessário a determinação da dosagem ideal de β -NGF no meio de maturação. Com o presente trabalho, objetiva-se determinar a partir de qual concentração o β -NGF é citotóxico para os ovócitos e células do cúmulo por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A citotoxicidade do β -NGF foi avaliada em complexos cúmulo- oóforos (CCOs) e foram testadas as concentrações de 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 350 ng/ml, 500 ng/ml e 1000 ng/ml no meio de MIV. Para a avaliação da citotoxicidade os CCOs foram avaliados em microscópio EVOs com marcação para espécies reativas de oxigênio (EROs). A maior concentração que não for pior do que os valores do grupo controle seria, teoricamente, a mais adequada para ser utilizada nas rotinas de PIVE. Foi possível observar que as concentrações até 200ng/mL não apresentam diferença estatística significativa quanto ao grupo controle, sendo assim a maior concentração que causa ainda efeitos benéficos sem acarretar em um aumento significativo de EROs.

Palavras-chave: fertilização *in vitro*; beta-NGF; DCF, ERO; espécie reativa de oxigênio.

ABSTRACT

The *in vitro* production of embryos (IVP) has already been a widely used technique in Brazil applied to animal reproduction, standing out in the evolution of efficiency in cattle farming. However, this biotechnology still has low efficiency in the utilization of oocytes and, therefore, needs to be improved. There are already studies that have verified positive effects of supplementation with 100 ng/ml of the β -NGF protein in the *in vitro* oocyte maturation (IVM) medium. However, on the other hand, there are studies that demonstrate possible cytotoxic effects with supplementation of 500 ng/ml of β -NGF protein in the same medium. Therefore, it is still necessary to determine the ideal dosage of β -NGF in the maturation medium. The present study aims to determine from which concentration β -NGF is cytotoxic to oocytes and cumulus cells through the production of reactive oxygen species (ROS). The cytotoxicity of β -NGF was evaluated in cumulus-oocyte complexes (COCs), and the concentrations of 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 350 ng/ml, 500 ng/ml, and 1000 ng/ml were tested in the IVM medium. For the evaluation of cytotoxicity, the COCs were analyzed under an EVOs microscope with staining for reactive oxygen species (ROS). The highest concentration that is not worse than the values of the control group would, theoretically, be the most suitable to be used in IVP routines. It was possible to observe that concentrations up to 200 ng/mL do not show a statistically significant difference compared to the control group, thus being the highest concentration that still causes beneficial effects without resulting in a significant increase in ROS.

Keywords: *in vitro* fertilization; beta-NGF; DCF; ROS, reactive oxygen species.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVO	13
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3.1	Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE) em bovinos	13
3.2	Fator de crescimento nervoso βNGF (β-NGF) e a PIVE	14
3.3	Efeitos citotóxicos do β-NGF	15
4	METODOLOGIA.....	17
4.1	ANÁLISE DE IMAGEM COMPUTACIONAL.....	17
4.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
5	RESULTADOS	20
6	DISCUSSÃO	21
7	CONCLUSÃO	23
8	REFERÊNCIAS.....	24

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados compilados por Gonçalves & Viana (2019), o Brasil consolidou-se como líder mundial na produção *in vitro* de embriões (PIVE) a partir de 2007, respondendo por cerca de 48% da atividade global. No entanto, em 2023 a produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil caiu 20,2% em relação a 2022. Também em 2023 o Estados Unidos da América produziu quase um milhão de embriões, o que equivale mais do que o dobro do produzido no Brasil (Vianna, 2024). Isso demonstra a necessidade da melhoria da biotecnologia da PIVE no Brasil.

Apesar dos avanços metodológicos, a taxa de desenvolvimento embrionário *in vitro* ainda permanece abaixo do ideal (Hellstern, 2022), ademais, estudos demonstram que embriões produzidos *in vitro* apresentam uma criotolerância menor do que aqueles produzidos *in vivo* (Ferré *et al.*, 2019), o que justifica o interesse crescente em estratégias que aprimorem a competência ovocitária e a viabilidade embrionária ao longo das etapas da PIVE. Nos dias de hoje, os avanços na PIVE buscam melhorar o desempenho geral em todos os estágios, dentre eles, a maturação *in vitro* (Ferré *et al.*, 2019).

A PIVE é composta por três etapas principais, sendo elas a maturação *in vitro* (MIV) dos ovócitos, a fertilização *in vitro* (FIV) com espermatozoides capacitados e o cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões até estágio de blastocisto (Maciel *et al.*, 2025). Esses estágios asseguram a competência ovocitária, a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial, mas, apesar de avanços no controle laboratorial, ainda menos de 40% dos ovócitos maturados chegam a fase de blastocisto (Martins, 2023) e os embriões produzidos frequentemente apresentam qualidade inferior aos obtidos *in vivo* (Hellstern, 2022).

Na busca por aumentar a eficiência da PIVE, vários fatores vêm sendo estudados como aditivos aos meios de cultura. Dentre eles está o fator de crescimento nervoso β (β -NGF), uma proteína da família das neurotrofinas, originalmente descrita por sua atuação no crescimento e sobrevivência neuronal durante o desenvolvimento embrionário, mas que também apresenta funções relevantes no sistema reprodutivo de mamíferos (Crispo *et al.*, 2016). Na PIVE, a suplementação dos meios de MIV (Martins, 2023), FIV (Hellstern, 2022) e CIV (Crispo *et al.*, 2016) com o β -NGF tem sido investigada como forma de melhorar a competência ovocitária e as taxas de clivagem; no entanto, resultados divergentes têm sido observados. Martins (2023) observou que a suplementação do meio de maturação com 100ng/ml de NGF influencia positivamente na eficiência da produção *in vitro* de embriões, favorecendo a clivagem e a

formação de blastocistos. Contudo, quando os meios foram suplementados com 500ng/ml, não houve diferença quanto ao grupo controle, ressaltando que além de não haver diferença, a taxa de clivagem do grupo controle foi ainda superior do que aqueles suplementados com 500ng/ml, possivelmente por apresentar um efeito citotóxico em concentrações maiores. Chung e Hong (1998) demonstraram que o NGF pode induzir citotoxicidade em células PC12 sobre condições de hipoglicemia, reforçando a hipótese de que concentrações elevadas podem comprometer a viabilidade celular. Outro trabalho ainda demonstrou que o β -NGF em excesso prejudicou a comunicação bidirecional entre ovócito e células do cúmmulos por meio de um receptor de alta afinidade presente nas células do cúmmulos, resultando em menor competência ovocitária (Zhai *et al.*, 2018). Tais achados ressaltam a necessidade de determinar a concentração ideal do β -NGF nos protocolos de PIVE.

Os mecanismos pelos quais o β -NGF pode exercer efeitos citotóxicos ainda não estão totalmente elucidados, mas evidências sugerem que concentrações elevadas dessa neurotrofina podem desencadear repostas celulares adversas (Chung; Hong, 1998). Em células PC12, foi relatado que o tratamento com NGF foi associado ao aumento dos níveis de cálcio intracelular, sendo um fator determinante na morte celular mediada pelo NGF (Chung; Hong, 1998). No contexto reprodutivo, alterações na comunicação entre ovócito e células do cúmmulos podem afetar a transferência de sinais moleculares e nutrientes essenciais para o posterior desenvolvimento embrionário (Zhai *et al.*, 2018). Essas observações reforçam a hipótese de que a suplementação com o NGF deve considerar não apenas o momento de adição nos meios, mas também a concentração capaz de promover benefícios sem induzir citotoxicidade.

Assim, apesar dos avanços sobre o entendimento dos efeitos do β -NGF sobre a PIVE, os resultados obtidos até hoje ainda são pouco elucidados, necessitando de melhor esclarecimento sobre o quanto de β -NGF é realmente benéfico. Enquanto alguns trabalhos demonstram aumento na taxa de clivagem e melhora na qualidade embrionária com determinadas concentrações (Martins, 2023), outros apontam que certas doses possam talvez comprometer a viabilidade celular e reduzir o sucesso (Hellstern, 2022; Martins, 2023). Além disso, a maior parte das pesquisas sobre citotoxicidade concentra-se em modelos celulares não reprodutivos, o que limita a extrapolação dos dados para a PIVE (Chung; Hong, 1998; Zhai *et al.*, 2018). Assim, é de grande importância buscar investigar como as diferentes concentrações de β -NGF afetam cada etapa da PIVE, considerando taxa de desenvolvimento, potenciais efeitos citotóxicos e otimizando os protocolos.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas altamente reativas resultantes da redução do oxigênio por elétrons durante o metabolismo celular. Essas espécies atuam como segundos mensageiros em vias de sinalização e controle celular apresentando papel importante no desenvolvimento embrionário, proliferação e diferenciação celular (Jamil *et al*, 2020). Em geral, as EROs são subprodutos naturais do metabolismo celular e são fundamentais para a homeostase celular. Em condições fisiológicas, sistemas antioxidantes naturais mantêm o equilíbrio entre a produção e a neutralização dessas espécies reativas, quando esse equilíbrio é rompido, uma quantidade excessiva de EROs será produzida sem a correspondente eliminação, levando ao estresse oxidativo, acarretando desde morte celular devido a danos ao DNA, proteínas, carboidratos, lipídeos e homeostase, até defeitos no metabolismo celular, na morfologia ou nas vias de sinalização (Costa *et al*, 2022).

Durante a MIV, os efeitos das EROs sobre ovócitos e desenvolvimento embrionário ainda são controversas, concentrações elevadas de EROs na maturação exercem um efeito negativo nos embriões bovinos antes do estágio de blastocisto, entretanto, há evidências de que essas espécies podem também desempenhar funções regulatórias na atividade celular, controlando a produção e a ativação de substâncias (Morado *et al*, 2009). Foi observado que durante 22h de maturação os níveis de EROs sofreram uma flutuação, fato que foi relacionado com as variações do metabolismo celular das CCOs durante o processo de maturação, além disso, foi demonstrado que o consumo de oxigênio pelas CCOs aumenta durante a MIV em decorrência da fosforilação oxidativa mitocondrial (Morado *et al*, 2009). Dessa forma, evidencia-se que durante a etapa da MIV existe uma produção de EROs natural, contudo, essa produção não deve ultrapassar a capacidade da célula de produzir substâncias antioxidantes, fator que pode ocorrer devido a diversos motivos, como a adição de substâncias ao meio em concentrações inadequadas.

Além disso, um estudo evidenciou uma relação positiva entre a porcentagem de EROs produzidas pelas células da granulosas e o índice de apoptose nessas células, indicando uma associação entre aumento de EROs e ativação de mecanismos de morte celular, ademais, evidências demonstraram que níveis elevados de EROs podem causar danos ao ovócito e reduzir competência durante a fertilização (Jancar *et al*, 2007). O estresse oxidativo foi descrito também como um fator prejudicial às células da granulosa, podendo resultar desde crescimento anormal até perda da função, além disso, esse estresse pode interferir na comunicação entre ovócitos e células da granulosa, contribuindo para a redução da qualidade ovocitária (Costa *et*

al, 2022). Em condições normais e concentrações moderadas, EROs são essenciais para o desenvolvimento de ovócitos, desencadeando a retomada meiótica. Entretanto, foi demonstrado que nas condições de maturação *in vitro* os ovócitos são mais facilmente afetados pelo acúmulo de EROS, interferindo negativamente a integridade do fuso meiótico (Costa *et al*, 2022).

Considerando o potencial do β -NGF para modular processos celulares e reprodutivos, aliado às evidências de que concentrações elevadas podem prejudicar o desenvolvimento embrionário (Martins, 2023; Hellstern, 2022) e de que em determinadas condições induz morte celular (Chung; Hong, 1998), este estudo tem como objetivo avaliar as diferentes concentrações de β -NGF na etapa de maturação *in vitro* da PIVE e descobrir quais dessas concentrações são adequadas para melhorar a maturação dos ovócitos assim como os níveis que induzem possível citotoxicidade com aumento na produção de EROs.

Por fim, a compreensão dos efeitos do β -NGF sobre cada etapa da PIVE, com destaque para a fase de maturação, faz-se essencial para otimizar os protocolos de produção embrionária e aprimorar os índices reprodutivos da bovinocultura. Os resultados obtidos podem contribuir para a definição de protocolos eficientes e seguros, ampliando a possibilidade de aplicação de biotecnologias utilizando β -NGF na reprodução.

2 OBJETIVO

Verificar a partir de qual concentração o β -NGF no meio de maturação é citotóxico para os ovócitos, acarretando no aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos ovócitos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produção *in vitro* de embriões (PIVE) em bovinos

A produção *in vitro* de embriões vem sendo uma das biotecnologias mais utilizadas para aumentar a eficiência da reprodução da bovinocultura, isso se dá devido ao fato de possibilitar uma maior produção de embriões por vaca em um menor período (Martins, 2023). Dados demonstram que, apesar das flutuações que ocorreram nos últimos anos, com o Estados Unidos da América se aproximando de um milhão de embriões produzidos *in vitro*, o Brasil

ainda se destaca em segundo lugar nos maiores números de produção *in vitro* de embriões (Viana, 2024).

A técnica de PIVE compreende três fases: maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) (Maciel *et al.*, 2025). A maturação *in vitro* consiste na colocação dos ovócitos em condições controladas por 20 a 24h, sendo uma etapa importante, visto que é o momento em que ocorrem transformações nucleares e citoplasmáticas que viabilizam a futura fertilização (Martins, 2023), a competência e a qualidade ovocitária nessa fase representa um fator importante na determinação das taxas de desenvolvimento de blastocistos (Ferré *et al.*, 2019). A fertilização *in vitro* consiste no momento quando os ovócitos maturados e os espermatozoides são unidos a fim de que ocorra a fertilização e posterior formação do zigoto (Martins, 2023). E por fim, o cultivo *in vitro* desses embriões, momento em que as mórulas e blastocistos serão cultivados (Martins, 2023).

A PIVE é uma das biotécnicas relacionadas a reprodução mais importantes atualmente, pois possibilita uma maior produção e com alto potencial genético, contudo, é uma técnica de alto custo (Martins, 2023). Segundo dados do *10th International Ruminant Reproduction Symposium* (Viana *et al.*, 2018), A Argentina e o Brasil são detentores das indústrias de embriões mais ativas da América do Sul além de relatar também que a indústria brasileira de embriões sofreu grande aumento do ano de 2002 a 2012 dado principalmente devido ao uso comercial da PIVE, demonstrando assim como essa biotécnica tem impacto econômico na atividade pecuária, principalmente devido a alta demanda global por proteína animal e derivados do leite.

Além disso, a PIVE tem sido cada vez mais adotada comercialmente na produção de embriões bovinos em escala global com crescente interesse na otimização do rendimento e da qualidade dos blastocistos (Ferré *et al.*, 2019). Contudo, ainda existem limitações não resolvidas da PIVE que restringem uma implementação mais ampla como a redução da qualidade de ovócitos após a MIV, menor criotolerância embrionária e redução das taxas de prenhez (Ferré *et al.*, 2019).

3.2 Fator de crescimento nervoso β NGF (β -NGF) e a PIVE

O fator de crescimento nervoso β é uma neurotrofina, que, assim como as demais, é responsável pela proliferação, sobrevivência e diferenciação de células alvo (Chung; Hong,

1998), o β -NGF em particular promove a sobrevivência e o crescimento neuronal (Martins, 2023) mas, estudos sugerem que o essa neurotrofina está relacionado da mesma forma na ovulação em animais de ovulação induzida à medida que induz a secreção do GnRH (hormônio liberador das gonadotrofinas) (Ratto *et al.*, 2019).

O β -NGF hoje é conhecido na reprodução devido a associação com a ovulação em animais de ovulação induzida (como camelídeos e gatos), pois dependem de um estímulo mecânico proveniente da cópula para acarretar sinais nervosos que induzem a secreção de GnRH e após isso um pico de LH que induzirá a ovulação, diante disso, um fator de indução de ovulação foi encontrado no plasma seminal e posteriormente isolado em camelídeos, tal fator é conhecido como fator de crescimento nervoso (β -NGF) (Ratto *et al.*, 2019). Ademais, atualmente, sabe-se que a atuação do β -NGF vai além do sistema nervoso, tendo ações exercidas em outros tecidos como testículos e ovários, indicando um potencial ação na fisiologia espermática e folicular (Paiva *et al.*, 2022). Dessa forma, nos dias de hoje pesquisas são feitas em torno na PIVE buscando formas de aperfeiçoar toda essa biotecnica, desde a composição dos meios como também a suplementação com certas substâncias, tal qual o β -NGF. Assim, estudos buscam avaliar a utilização desse fator nas etapas da PIVE a fim de descobrir os possíveis mecanismos de ação que essa substância pode ter nos meios que compõe o processo de produção de embriões (Martins, 2023).

Isto posto, sabe-se que o β -NGF tem sido estudado como suplemento nos meios de maturação, fertilização e cultivo *in vitro* com o objetivo de melhorar a competência ovocitária, as taxas de clivagem e o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (Martins, 2023; Hellstern, 2022; Crispo *et al.*, 2016). Estudos demonstram a presença do β -NGF e de seus receptores expressos em células da granulosa, células da teca, células intersticiais e células luteínicas de ovários, demonstrando uma regulação por parte do NGF no trato reprodutivo (Ren *et al.*, 2005).

3.3 Efeitos citotóxicos do β -NGF

Embora o β -NGF seja conhecido por seus efeitos citoprotetores e benéficos na reprodução (Hellstern, 2022; Martins, 2023), pesquisas em modelos celulares não reprodutivos tem demonstrado que essa neurotrofina possa induzir efeitos citotóxicos. Chung & Hong (1998) relatam que, embora acreditem no efeito protetor do NGF contra diversos tipos de morte

celular e que a morte celular relacionada a neurotrofinas normalmente é consequência da retirada dessa neurotrofina ao invés da exposição a mesma, um estudo envolvendo células PC12 (células feocromócitas) em condições de abstinência de glicose foi desenvolvido, nesse experimento foi possível observar que as células que receberam a suplementação com NGF apresentaram uma taxa de morte celular elevada associado a um aumento de cálcio intracelular adicional que já havia se elevado devido à falta de glicose, dessa forma, concluiu-se a possibilidade de o fator β ter sido responsável pelo aumento adicional de cálcio em células em situação de hipoglicemia, foi sugerido que esse aumento de íons cálcio intracelular tenha ocorrido através de duas vias diferentes, influxo de cálcio e liberação de cálcio das reservas internas, caso a hipótese seja verdadeira, é possível que o aumento de cálcio pelo NGF através das membranas internas possa desempenhar um papel na indução da morte celular.

Ademais, atualmente, um estudo utilizando CCOs de camundongos para observar o efeito de diferentes concentrações de NGF na maturação dos ovócitos relatou que 10 e 100ng/ml suprimiram a extrusão do primeiro corpúsculo polar, etapa importante na maturação meiótica dos ovócitos e que 1000ng/ml apresentaram efeito supressor ainda mais forte. Foi relatado que o efeito inibitório na maturação do ovócito pela adição excessiva do NGF se deu por meio da comunicação bidirecional entre o ovócito e as células do cúmmulos por meio do receptor de alta afinidade NTRK1 presente nas células do cúmmulos mas não nos ovócitos. Além disso, o estudo faz associação do NGF com doenças ovarianas, como a síndrome do ovário policístico (SOP), relacionando a alta quantidade de NGF no fluido folicular com uma menor resposta ovariana, o estudo em camundongos demonstrou que a produção elevada de forma anormal de NGF nos ovários é suficiente para iniciar várias alterações estruturais e funcionais associadas ao desenvolvimento de cistos foliculares (Zhai *et al.*, 2018).

Na produção *in vitro* de embriões, uma possível citotoxicidade tem sido relatada em estudos que investigaram a suplementação nos meios de maturação, no qual, a suplementação com 500ng/ml demonstrou um efeito negativo, não sendo indicado na PIVE, contudo, não se sabe qual mecanismo acarretou tal processo (Martins, 2023). Outro estudo feito utilizando NGF durante a fertilização *in vitro* avaliando complexos cúmulo-ovócitos após condições de maturação *in vitro* com choque térmico e sem choque térmico, demonstrou que não houve diferença entre os tratamentos quanto a clivagem e blastocisto, ademais, relatou que o NGF não melhora as taxas de desenvolvimento embrionário em condições padrão, mas que talvez tenha um fator citoprotetor (Hellstern, 2022)

4 METODOLOGIA

Foram utilizados ovários coletados de frigoríficos e que passaram por processo de aspiração folicular. Posteriormente, o aspirado folicular passou pelo processo de rastreio e seleção de complexos cúmulo-oóforo (CCOs), sendo selecionados apenas aqueles em Grau I e Grau II (Martins, 2023). Esses CCOs foram colocados em tubos de maturação, divididos em sete grupos:

G1 (n=20)	Controle
G2 (n=20)	50 ng/ml de β -NGF
G3 (n=20)	100 ng/ml de β -NGF
G4 (n=20)	200 ng/ml de β -NGF
G5 (n=20)	350 ng/ml de β -NGF
G6 (n=20)	500 ng/ml de β -NGF
G7 (n=20)	1000 ng/ml de β -NGF

Esses CCOs passaram pelo processo de maturação por 22h em estufa na temperatura de 38,5°C, umidade saturada e atmosfera com 5% de CO₂. O meio MIV utilizado foi adquirido do laboratório Vitrogen IVF Biotech LTDA.

Após 22h de MIV, os CCOs foram lavados em duas gotas de 100 μ L PBS a 1% de soro fetal bovino. Após isso, os CCOs foram colocados em uma gota de 100 μ L de solução de diclorofluoresceína (DCF) para análise de espécies reativas de oxigênio (EROs).

O grupo de CCOs foi incubado por 30 minutos após a colocação no marcador. Após a incubação, os grupos passaram por 1 gota de 100 μ L de formaldeído para fixação do marcador por 15 minutos. Após isso, foram feitas duas lavagens em duas gotas de 100 μ L de PBS a 1% de soro fetal.

Por fim os CCOs foram coletados e colocados em lâminas com 1 gota de Antifading (*Fluoroshield with DAPI*) e analisados em microscópio EVOs para captura de imagens dos CCOs marcados. As imagens foram adquiridas com objetiva de 20x, com fluorescência GFP, brilho de 4%, ajuste mínimo de 100 e máximo de 255 e phase 4x/10x.

4.1 ANÁLISE DE IMAGEM COMPUTACIONAL

As capturas das imagens foram feitas utilizando microscópio Invitrogen EVOS M3000 Imaging System na objetiva de 20x e calibração para GFP (Green Fluorescent Protein), com brilho de 4%.

A partir das imagens capturadas foi realizada a segmentação dos ovócitos de forma interativa, utilizando-se o software Paint Shop Pro versão 8.10. As imagens segmentadas de ovócitos foram avaliadas por um algoritmo desenvolvido em ambiente Scilab. Este algoritmo transforma a imagem colorida em tons de cinza e quantifica a fluorescência por meio da densidade óptica integrada invertida.

Em análise de imagem, a densidade óptica pontual (DO) é uma medida quantitativa do grau de escurecimento ou opacidade de um pixel de uma imagem, representando a capacidade de um material absorver a luz. Já a densidade óptica pontual invertida é uma medida quantitativa do grau de fluorescência de um pixel de uma imagem. A densidade óptica integrada (DOI) é a somatória da DO pontual, seja invertida ou não, de todos os pixels que constituem a região de interesse (ROI), que no caso seria todo o ovócito.

No presente trabalho, para minimizar o efeito da fluorescência de fundo (“background”), que poderia atrapalhar em encontrar a fluorescência verdadeira do ovócito, foi subtraída de cada densidade óptica pontual invertida, o valor da densidade óptica pontual invertida média do fundo da imagem. Para isso, não foi utilizado todo o fundo da imagem, pois frequentemente existiam artefatos fluorescentes, sendo então escolhida uma região do fundo sem artefatos para calcular o valor da densidade óptica pontual invertida média do fundo. Só depois disso foi calculada a densidade óptica integrada do ovócito, ou seja, a somatória dos valores da densidade óptica pontual subtraída da densidade óptica do fundo.

Como valores de pixel não possuem unidade, a densidade óptica integrada também não possui unidade.

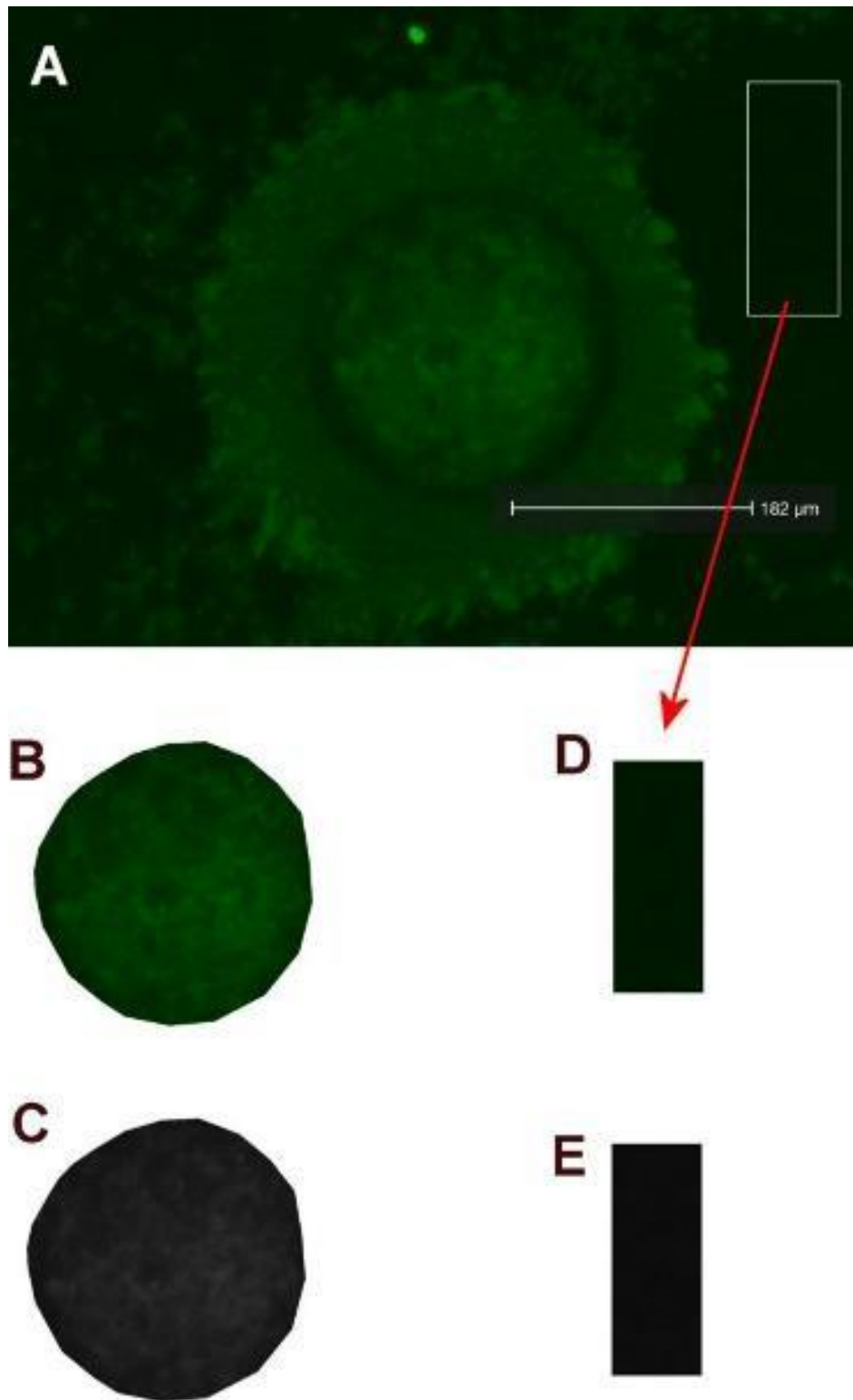


Figura 1: Esquema demonstrando as etapas da análise de imagem dos ovócitos. A – Eletromicrografia original; B – Ovócito segmentado colorido; C – Ovócito segmentado em tons de cinza; D – Região representativa de fundo colorido; E – Região representativa de fundo em tons de cinza.

4.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov verificou-se que os dados possuíam distribuição normal. Para verificar possíveis diferenças entre os grupos, foi utilizado o teste “t” de Student ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

A presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) no controle e nas diferentes concentrações de β -NGF estão demonstradas na figura 2:

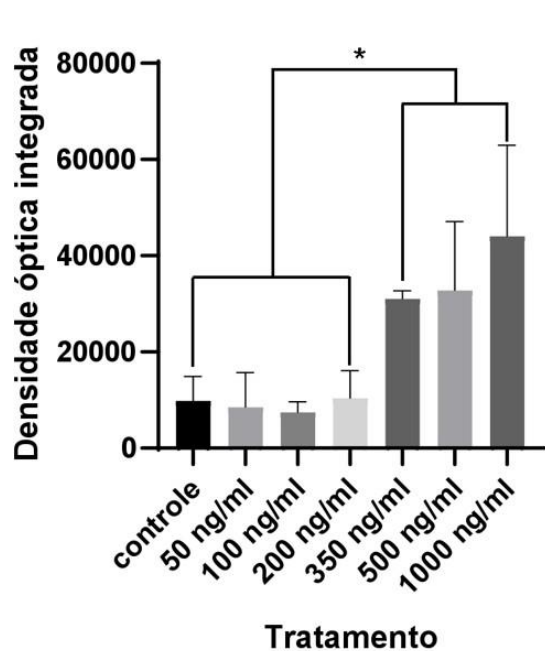


Figura 2: Gráfico representativo da média e desvio padrão da densidade óptica integrada para cada concentração de B-NGF testada. *:Demonstra diferença significativa ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos e a avaliação estatística demonstram que as concentrações de 50, 100 e 200ng/ml não apresentaram diferença estatística entre si nem quanto ao grupo controle. Ou seja, o tratamento com β NGF nestas concentrações não induziu aumento na produção de EROs, não existindo efeito citotóxico devido a esse aumento. Já as concentrações de 350, 500

e 1000 ng/ml produziram maiores quantidades de EROs, apresentando diferença estatística considerável com as concentrações de 50 ng/ml, 100 ng/ml e 200 ng/ml e o grupo controle, indicando possível efeito citotóxico decorrente do aumento de EROs.

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstraram que as concentrações de 50ng/ml, 100 ng/ml e 200 ng/ml de β -NGF no meio de maturação in vitro não causaram aumento na quantidade de EROs nos ovócitos quando comparados entre si e com o grupo controle, demonstrando que essas concentrações não causaram efeitos citotóxicos provocado pelo aumento de EROs. Já as concentrações acima de 200ng/ml demonstraram diferença estatística significativa do controle, ou seja, houve maior produção de espécies reativas de oxigênio pelos ovócitos maturados nos meios com as concentrações de 350ng/ml, 500 ng/ml e 1000ng/ml.

Isso corrobora com o que foi observado por Martins (2023), que relatou que ao suplementar os meios de maturação com a concentração de 500ng/ml de β -NGF na MIV os ovócitos não apresentaram diferenças quanto ao grupo controle assim como foi relatado também que a taxa de clivagem foi menor do que o grupo controle, levantando a possibilidade de um possível efeito citotóxico. Martins (2023) utilizou as concentrações de 100ng/ml e 500ng/ml, enquanto o presente trabalho fez o uso de concentrações intermediárias a fim de determinar a maior concentração que não apresente parâmetros piores do que os valores do grupo controle com o objetivo de determinar a partir de qual concentração maiores quantidades de EROs foram produzidas decorrente da suplementação levando a um provável efeito citotóxico. Dessa forma, este trabalho valida o que já foi anteriormente relatado por Martins (2023), que o β -NGF pode apresentar um efeito citotóxico em concentrações maiores, relatando que a concentração ideal, considerando a etapa de maturação, que ainda causa efeitos benéficos sem aumentar consideravelmente a quantidade de EROs, é a de 200ng/ml de β -NGF.

Trabalhos em torno da citotoxicidade de fatores de crescimento, como o β -NGF vem sendo feitos a fim de determinar de que forma tais fatores podem induzir respostas adversas. Chung e Hong (1998) demonstraram por meio de modelos celulares não reprodutivos que a suplementação de células em situação de hipoglicemia com a neurotrofina β -NGF acarretou um aumento de cálcio intracelular, levantando a hipótese que esse aumento possa ter ocorrido por meio de influxo de cálcio ou liberação de cálcio das reservas celulares internas. Já Zhai (2018), utilizando COCs de camundongos, observou que a suplementação de β -NGF causou

efeito inibitório da maturação dos ovócitos por meio da comunicação entre as células do cúmulus e ovócito por meio do receptor NTRK1 presente nas células do cúmulus. Com o presente trabalho, foi possível observar o aumento de EROs mas não qual mecanismo levou a esse processo, considerando que Zhai (2018) relatou uma interrupção da maturação dos ovócitos de camundongos por meio da comunicação bidirecional de ovócito e célula do cúmulus, é possível que esse mesmo mecanismo tenha causado um aumento das espécies reativas nas concentrações acima de 200ng/ml, contudo, mais estudos são necessários.

Ademais, outro trabalho utilizando a suplementação com NGF durante a FIV após condições de maturação *in vitro* com e sem estresse térmico buscou determinar se essa suplementação poderia melhorar o desenvolvimento dos embriões e avaliar se o NGF apresenta atuação protetora, mitigando os maléficos do estresse térmico (Hellstern, 2022). O estudo pôde concluir que a suplementação do NGF durante a fertilização *in vitro* não apresenta efeito protetor frente aos danos do estresse térmico durante a MIV, além disso, foi observado um efeito negativo do NGF nas taxas de clivagem em 24 horas nos ovócitos não submetidos ao estresse térmico, contudo, esse efeito foi transitório. Tais resultados levantam a possibilidade de que a concentração ou o momento da exposição do NGF possa desencadear respostas celulares desfavoráveis, com possível citotoxicidade, tal fator foi observado no presente trabalho, demonstrando que em concentrações acima de 200ng/ml maiores quantidades de espécies reativas de oxigênio foram encontradas, acarretando no estresse oxidativo e podendo tornar o meio possivelmente citotóxico para os ovócitos.

Quanto a produção de EROs, foi possível observar com o presente trabalho que as concentrações acima de 200ng/ml apresentaram maior produção de EROs do que as concentrações menores e do que o grupo controle. A produção de EROS é intrínseca à produção de ATP pelas mitocôndrias e portanto, qualquer célula eucariótica produz naturalmente EROs. No entanto, as células possuem mecanismos antioxidantes que controlam a quantidade de EROs celular. Uma quantidade excessiva de EROs, por excesso de produção ou por falha do sistema antioxidante, é denominado de estresse oxidativo, que pode acarretar a morte celular por danos ao DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos das células. Ou seja, as concentrações acima de 200ng/ml de β -NGF apresentaram maior produção de EROs, fator esse que pode ser natural da célula, decorrente do aumento do metabolismo durante a maturação e consequentemente da atividade mitocondrial ou por uma falha nos sistemas antioxidantes ou aumento de produção decorrente da suplementação com a neurotrofina, podendo levar a um estresse oxidativo, que pode acarretar em um grande efeito citotóxico (Costa *et al*, 2022).

Morado *et al* (2009) realizou um estudo para analisar espécies reativas de oxigênio na

maturação ovocitária *in vitro* de bovinos e relatam que o efeito das EROs sobre os ovócitos ainda é controverso, uma vez que concentrações elevadas durante a maturação podem exercer um efeito negativo sobre os embriões, contudo, apesar desse efeito, essas espécies também desempenham funções celulares importante de regulação e ativação de substâncias. No presente trabalho, houve uma pequena produção de EROs pelo grupo controle, demonstrando que uma produção natural em baixa quantidade ocorre decorrente do metabolismo dos ovócitos durante a maturação (Morado *et al*, 2009). Como o presente trabalho analisou a ação do β -NGF apenas durante a maturação, sem completar todas as etapas da PIVE, não é possível afirmar sobre o efeito destes achados nos embriões produzidos ao final do processo. Assim, mais estudos são necessários.

Foi descrito que o estresse oxidativo pode atuar como fator prejudicial para as células da granulosa e interferir na comunicação entre ovócitos e células da granulosa, reduzindo a qualidade dos ovócitos (Jancar *et al*, 2007). Zhai (2018) demonstrou que a adição excessiva de NGF causa efeito inibitório na maturação ovocitária por interferir na comunicação bidirecional entre ovócito e célula do cúmmulos. Considerando os resultados do presente trabalho, possivelmente as maiores concentrações de β -NGF causem maior índice de EROs, fator esse que pode ser natural do aumento do metabolismo durante a maturação ou por falha no equilíbrio entre produção e eliminação, que acarreta em um estresse oxidativo nas CCOs, interferindo na comunicação bidirecional entre ovócito e células do cúmmulos.

7 CONCLUSÃO

Com o presente trabalho, pode-se concluir que a suplementação de β -NGF nas concentrações de 50, 100 e 200ng/ml não aumentam a quantidade de espécies reativas de oxigênio. Já as concentrações de 350, 500 e 1000ng/ml provocaram maior produção de EROS, causando um possível efeito citotóxico sobre os ovócitos e não são indicadas para as rotinas de PIVE. Contudo, maiores estudos em torno da concentração de 200ng/ml são necessários já que no presente estudo pôde-se concluir apenas que essa concentração de β -NGF não aumenta a quantidade de EROs consideravelmente mas não quais os efeitos sobre os embriões que serão formados e, considerando que não houve diferença estatística quanto as concentrações menores, é necessário entender se os efeitos das menores concentrações sobre os embriões serão melhores, a fim de usar menores quantidades da neurotrofina.

8. REFERÊNCIAS

CHUNG, J.; HONG, J. NGF-induced cytotoxicity in PC12 cells in a hypoglycemic environment. *NeuroReport*, v. 9, n. 11, p. 2495–2500, 1998. <https://doi.org/10.1097/00001756-199808030-00013>. Disponível em: <http://journals.lww.com/00001756-199808030-00013>.

CRISPO, M.; 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 sheep1,2. *Journal of Animal Science*, v. 94, n. 10, p. 4447–4451, 1 out. 2016. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas.2016-0736>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article/94/10/4447/4702253>.

COSTA, A. P. R. *et al.* Influência das espécies reativas de oxigênio durante o cultivo in vitro de oócitos e folículos ovarianos de mamíferos domésticos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 46, n. 1, p. 28–42, jan./mar. 2022.

FERRÉ, L. B. *et al.* Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, Cambridge, v. 13, n. 6, p. 1003–1016, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>.

GONÇALVES, R. L. R.; VIANA, J. H. M. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 43, n. 2, p. 156–159, abr./jun. 2019.

HELLSTERN, E. **Determining the effects of nerve growth factor- β supplementes in vitro fertilization media on bovine embryo development.** 2022. Dissertação (Mestrado em Biomedical and Veterinary Sciences) – Virginia Polytechnic Institute and State University Blacksburg, Blacksburg, VA, 2022. Disponível em: <https://vtechworks.lib.vt.edu/server/api/core/bitstreams/b35dcb81-5379-4e47-86b6-4b921763fe56/content>.

JAMIL, M. *et al.* Reactive oxygen species in reproduction: harmful, essential or both? *Zygote*, Cambridge, v. 28, n. 4, p. 255–269, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0967199420000179>.

JANCAR, E. V. *et al.* Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, New York, v. 24, n. 3, p. 91–97, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10815-006-9103-8>.

MACIEL, K. C.; MASQUIO, J. A.; TEIXEIRA, M. M. Produção in vitro de embriões bovinos: Revisão de literatura. *Research, Society and Development*, v. 14, n. 6, p. e6314649073, 17 jun. 2025. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v14i6.49073>. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/49073>.

MARTINS, M. C. **Avaliação da suplementação do meio de maturação in vitro de ovócitos bovinos com beta-NGF.** 2023. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2023. DOI: : <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2023.7048>. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/41302>.

MORADO, S. A. *et al.* Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 49, n. 3, p. 404–413, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD08198>.

PAIVA, L. *et al.* The ovulatory and luteotropic actions of the male-derived beta-nerve growth factor in South American camelids. **Animal Frontiers**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 87–95, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/af/vfac037>.

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.4, p.R199-R207, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1530/REP-18-0305>. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/aop/rep-18-0305/rep-18-0305.xml>.

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. DOI: <https://doi.org/10.1262/jrd.16082>. Disponível em: http://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/51/3/51_3_399/article

VIANA, J. H. M. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, v .42, n.4, 2024. Disponível em: https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2023.pdf?utm_source

VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; GONÇALVES, R. L. R.; SIQUEIRA, L. G. B. A historical perspective of embryo-related technologies in South America. **Animal Reproduction**, v. 15, n. Suppl. 1, p. 963–970, 2018. DOI: <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0016>. Disponível em: <http://www.animal-reproduction.org/article/doi/10.21451/1984-3143-AR2018-0016>.

ZHAI, Y.; YAO, G.; RAO, F.; WANG, Y.; SONG, X.; SUN, F. Excessive nerve growth factor impairs bidirectional communication between the oocyte and cumulus cells resulting in reduced oocyte competence. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, n. 1, p. 28, dez. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0349-7>. Disponível em: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-018-0349-7>.