

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CDTec - Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Curso de Graduação em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso



**Avaliação do resveratrol nanoencapsulado na maturação *in vitro* de oócitos
bovinos**

Morgana Alves Borges

Pelotas, 2017

Morgana Alves Borges

**Avaliação do resveratrol nanoencapsulado na maturação *in vitro* de oócitos
bovinos**

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador acadêmico: Tiago Veiras Collares

Orientador de estágio: Mariana Härter Remião

Pelotas, 2017

Morgana Alves Borges

Avaliação do resveratrol nanoencapsulado na maturação *in vitro* de oócitos bovinos

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 29/11/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Tiago Veiras Collares (Orientador)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Eliza Rossi Komninou
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

MSc. William Borges Domingues
Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B732 Borges, Morgana Alves

Avaliação do resveratrol nanoencapsulado na maturação in vitro de oócitos bovinos / Morgana Alves Borges ; Tiago Veiras Collares, Mariana Härter Remião, orientadores ; Eliza Rossi Komninou, William Borges Domingues, coorientadores. — Pelotas, 2017.

60 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Maturação in vitro. 2. resveratrol. 3. nanocápsulas de núcleo lipídico. I. Collares, Tiago Veiras, orient. II. Remião, Mariana Härter, orient. III. Komninou, Eliza Rossi, coorient. IV. Domingues, William Borges, coorient. V. Título.

CDD : 636.0824

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais, Helena e Mogar, por todo amor que me é dedicado e acima de tudo, por todo apoio e confiança na realização dos meus sonhos. Vocês são a razão pelo qual tenho forças para continuar. À vocês, dedico esta conquista e meu amor eterno!

Aos meus avós, que de onde quer que vocês estejam, eu continuo lutando para dar orgulho á vocês! Foi uma honra vivenciar o amor que a mim foi concedido.

Aos meus irmãos de coração, Bianca, Gabriela, Kerlon e Nilmar, pelo apoio, carinho e motivação durante esta trajetória. Vocês são essenciais para mim, amo-os!

À minha afilhada, Mariana, que me incentiva a ser uma pessoa melhor todos os dias. À ti, minha pequena, agradeço pelos ensinamentos e pelo amor sincero, a dinda te ama.

Aos meus familiares e padrinhos, que estiveram sempre presentes, principalmente ao Mário Josias que foi meu grande anjo da guarda durante toda minha graduação. Obrigada por todo o amor e carinho a mim dedicado!

Aos meus amigos, que aguentaram firmes ao meu lado nos momentos mais difíceis da minha vida, principalmente, ao Andreo Borges, Bianca Borba e Letícia Collares, pelo incentivo, por todos os conselhos e demonstrações de amor. Amo vocês!

Aos amigos que fiz durante esta caminhada, Ana Laura feijó, Isadora Lopes, Júlia Damé, Juliana Röpke, Lucas Santos, Marina Cardoso, Morgana Azevedo, valeu a pena todo o esforço e as dificuldades que passamos juntos! Sem vocês a graduação não teria graça. Obrigada por tudo, eu amo vocês!

Aos Mestres, que com amor ensinaram e construíram em conjunto os nossos conhecimentos, principalmente ao meu orientador Profº. Dr. Tiago Collares, pela

oportunidade que me foi concedida e a amizade que foi consolidada durante este período.

À Prof^a. MSc. Mariana Härter Remião, por todo o carinho e auxílio durante o período mais difícil desta etapa. A sua dedicação e amor ao ensinar é imensurável. Foste muito importante para minha formação, muito obrigada!

À Prof^a. Dr^a. Priscila Marque Moura de Leon, obrigada pela amizade, por todos os conselhos, incentivos e por acreditar em mim. És um exemplo de profissional a qual me espelho e tenho grande admiração.

À todos do Laboratório de Biotecnologia do Câncer, que me acolheram de braços abertos. Agradeço pela convivência e o aprendizado que obtive junto ao grupo.

À Universidade Federal de Pelotas pela infraestrutura, e a todos que contribuem de alguma forma para a formação de profissionais do Curso de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec).

Resumo

BORGES, Morgana Alves. **Avaliação do resveratrol nanoencapsulado na maturação *in vitro* de oócitos bovinos**. 2017, 60f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

A suplementação do meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos com resveratrol tem sido proposto para melhorar a competência de desenvolvimento de oócitos e elevar a taxa de produção de blastocistos em sistemas de produção *in vitro* de embriões (PIVE). Dentre os antioxidantes utilizados em cultivos *in vitro*, o resveratrol se destaca por minimizar os danos provocados pelo estresse oxidativo através de diferentes mecanismos. Entretanto, o resveratrol é um composto praticamente insolúvel em água e extremamente fotossensível, o que talvez limite sua utilização como suplemento em meios de cultivo *in vitro* comerciais. Nanocápsulas são sistemas de entrega de fármacos que foram desenvolvidos, visando dentre outros aspectos, a viabilização do uso de moléculas pouco hidrossolúveis e também de moléculas pouco estáveis, ou com maior suscetibilidade à degradação fotoquímica. Nanocápsulas de núcleo lipídico (LNCs) têm sido utilizadas com sucesso na entrega de antioxidantes durante a maturação de oócitos e o cultivo *in vitro* de embriões bovinos. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi determinar o efeito do resveratrol nanoencapsulado em LNCs frente ao processo de maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Para isso, oócitos obtidos através de punção folicular foram incubados em meio de maturação *in vitro* contendo concentrações de 2 μ M, 1 μ M e 0,5 μ M de resveratrol nanoencapsulado em LNCs ou de resveratrol em sua forma livre. Um grupo suplementado com LNCs sem o antioxidante e em volume correspondente ao da maior concentração testada e outro grupo que não recebeu qualquer suplementação, serviram como grupos controle. Posteriormente, os oócitos foram avaliados quanto a expansão das células do complexo cumulus *oophorus*, o estágio de maturação meiótica, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os níveis de glutathiona (GSH). Quanto ao índice de expansão das células do cumulus *oophorus* e as taxas de maturação, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais, sendo encontradas taxas de expansão parcial superiores a 74% e taxa de maturação superiores a 70% em todos os grupos testados. Foi observado que os grupos resveratrol livre (todas as concentrações) e resveratrol nanoencapsulado na concentração de 1 μ M obtiveram menores taxas de produção de EROs. E por fim, um significativo aumento na produção de GSH utilizando tanto o resveratrol livre, quanto o nanoencapsulado, em todas as concentrações quando comparados aos grupos controle foi constatado.

PALAVRAS-CHAVE: Maturação *in vitro*; Resveratrol; Nanocápsulas de Núcleo Lipídico

Abstract

BORGES, Morgana Alves. **Evaluation of nanoencapsulated resveratrol in the *in vitro* maturation of bovine oocytes.** 2017, 60f. Course Conclusion Work- Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

Supplementation of the *in vitro* maturation of bovine oocytes with resveratrol has been proposed to improve the competence of oocyte development and to increase the rate of blastocyst generation *in vitro* embryo production systems. Among the antioxidants used in *in vitro* cultures, resveratrol stands out for minimizing the damage caused by oxidative stress through different mechanisms. However, resveratrol is a practically water-insoluble and extremely photosensitive compound, which may limit its use as a supplement in commercial *in vitro* culture media. Nanocapsules are drug delivery systems that have been developed, aiming among other aspects, the feasibility of the use of molecules with little water-soluble and also of molecules that are not stable or with greater susceptibility to photochemical degradation. Lipid core nanocapsules (LNCs) have been successfully used in the delivery of antioxidants during oocyte maturation and *in vitro* culture of bovine embryos. In this context, the objective of the present work was to determine the effect of nanoencapsulated resveratrol on LNCs against the *in vitro* maturation process of bovine oocytes. For this, oocytes obtained through follicular puncture were incubated *in vitro* maturation medium containing concentrations of 2 μ M, 1 μ M and 0.5 μ M of nanoencapsulated resveratrol in LNCs or resveratrol in their free form. One group supplemented with LNCs without the antioxidant and in volume corresponding to the highest concentration tested and another group that did not receive any supplementation served as control groups. Afterwards, oocytes were evaluated for cumulus *oophorus* cell expansion, meiotic maturation stage, reactive oxygen species (ROS) production, and glutathione (GSH) levels. As for cumulus *oophorus* cell expansion index and maturation rates, no differences were observed between the experimental groups, with partial expansion rates above 74% and maturation rates higher than 70% in all groups tested. It was observed that the free resveratrol (all concentrations) and nanoencapsulated resveratrol groups in the concentration of 1 μ M obtained lower ROS production rates. And finally, a significant increase in GSH production using both free and nanoencapsulated resveratrol at all concentrations when compared to the control groups was found.

KEY-WORDS: *In vitro* maturation; Resveratrol; Lipid Core Nanocapsules

Lista de Figuras

Figura 1	Relação do estágio folicular com os níveis hormonais	20
Figura 2	Estrutura química do resveratrol	28
Figura 3	Sistema de punção de ovários	33
Figura 4	Avaliação da expansão das células do cumulus	34

Lista de Tabelas

Tabela 1	Mensuração dos níveis de EROs e GSH.....	39
----------	--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

°C	Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensageiro
CAT	Catalase
CCOs	Complexo Cumulus <i>oophorus</i>
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CSF	Fator citosólico
DCHFDA	Diacetato de 2', 7'-diclorodi-hidrofluoresceína
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Gramas
GSH	Glutathiona
GVBD	Degradação de vesículas germinativas
LD	Difração a laser
LH	Hormônio luteinizante
LNCs	Nanocápsulas de núcleo lipídico
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MPF	Fator promotor da maturação
NDA ⁺	Nicotonamida adenina dinucleotídeo

nm	Nanômetro
O ₂	Oxigênio
PBS	Phosphate buffer saline
PDI	Índice de polidispersidade
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PVP	Polivinilpirrolidona
SOD	Superóxido dismutase
UI	Unidades internacionais
UV	Ultravioleta
VG	Vesícula germinativa
β- (ME)	Beta mercaptoetano

Lista de Símbolos

% Por cento

< Menor

μ Micro

Sumário

1	Introdução.....	17
2	Objetivos	18
2.1	Objetivo Geral.....	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	Revisão de Literatura	19
3.1	Gametogênese e foliculogênese.....	19
3.1.1	Maturação citoplasmática do oócito.....	21
3.1.2	Maturação nuclear do oócito.....	22
3.2	Estresse oxidativo.....	23
3.3	Antioxidantes.....	24
3.3.1	Resveratrol.....	26
3.4	Nanocápsulas de núcleo lipídico	28
4	Metodologia	31
4.1	Reagentes e soluções.....	31
4.2	Preparação das nanocápsulas de núcleo lipídico (LNCs)	31
4.2.1	Caracterização das Nanocápsulas.....	31
4.3	Coleta dos ovários e classificação oocitária	32
4.4	Maturação in vitro (MIV).....	33
4.5	Avaliação da expansão das células do cumulus.....	34
4.6	Avaliação da maturação nuclear.....	34
4.7	Mensuração dos níveis de EROs e GSH	35
4.8	Análises estatísticas	36
5	Resultados	37
5.1	Expansão das células do cumulus	37
5.2	Maturação nuclear.....	38
5.3	Níveis de EROs e GSH.....	38

6 Discussão	40
7 Conclusão e perspectivas	43
Referências	44

1 Introdução

A aplicabilidade comercial da produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos é contraste do aperfeiçoamento das técnicas de maturação oócitaria *in vitro*, fecundação e cultivo embrionário *in vitro* (MIV, FIV e CIV, respectivamente) (FUKUI et al 1991). A PIVE contribui tanto no melhoramento de rebanhos comerciais, quanto para inúmeros estudos que visam desenvolvimento de tratamentos para a infertilidade humana (GIANAROLI et al., 2012; KNOX, 2014). Além disso, é uma ferramenta amplamente utilizada no ramo da ciência reprodutiva, a fim de monitorar e preservar espécies animais e sua biodiversidade (HOLT; BROWN; COMIZZOLI, 2014).

Atualmente, é uma biotecnologia reprodutiva vastamente empregada como metodologia de melhoramento genético, aumentando a eficiência do processo reprodutivo de animais de alto valor genético (BRACKETT et al. 1993). Entretanto, as proporções de embriões que chegam a estágio de blastocisto são inferiores a 40%, havendo raros relatos de superioridade deste índice (DALVIT et al 2005). Outro fato é que parte destes blastocistos produzidos constantemente possuem baixa qualidade e competência de desenvolvimento, limitando a eficiência da técnica na obtenção de animais nascidos (LONERGAN et al 2008).

A MIV é uma etapa crítica de todo o procedimento de PIVE, pois o oócito é uma célula altamente complexa que durante o processo de oogênese necessita armazenar componentes necessários tanto para alcançar a completa meiose quanto para auxiliar o desenvolvimento do posterior embrião (MTANGO et al 2008). Uma vez que a qualidade oocitária é essencial para progressão embrionária, é de suma importância a redução dos fatores que interferem neste processo, como por exemplo o estresse oxidativo (TAMURA et al 2008). O principal efeito resultante da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é o estresse oxidativo, o qual auxilia e estimula o processo de atresia folicular ocasionada pela apoptose das células da granulosa (HSUEH et al 1994; KAIPIA et al 1997).

Visto que a principal consequência da excedente produção de EROs advém da limitação dos sistemas de defesas antioxidantes (SUGINO et al., 2005), os meios de cultura *in vitro* são constantemente suplementados com diversos compostos antioxidantes, a fim de equilibrar a produção de EROs e fornecer o aporte nutritivo necessário para viabilidade embrionária (IWATA et al., 1998). Dentre os inúmeros compostos antioxidantes utilizados está o resveratrol. Esta molécula possui uma variedade de ações biológicas favoráveis, como por exemplo efeito antiinflamatório e antioxidante (PERVAIZ; HOLME, 2009). No que diz respeito às ciências reprodutivas, a suplementação do meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos com resveratrol tem sido relatada por ampliar a expressão proteica de SIRT1, gerando melhoria nos resultados de fertilização *in vitro* (TAKEO et al., 2013). Contudo, pelo fato de ser um composto fotossensível, quando exposta a luz, a molécula toma a conformação cis, que é classificada como instável, a qual não possui atividade biológica e assim inviabiliza sua comercialização (FULDA, 2010; RIUS et al., 2010; BASLY et al., 2000; CHEN et al., 2007).

Desta forma, estudos vêm buscando estratégias para contrapor as limitações da utilização do resveratrol, e assim, proteger o composto da degradação garantindo sua estabilidade e biodisponibilidade (AMRI et al., 2012). Uma alternativa promissora é a utilização de nanomateriais carreadores, os quais são sistemas de liberação controlada de fármacos. Eles foram projetados com a finalidade de reduzir a toxicidade de moléculas e medicamentos, proporcionando assim uma melhora na efetividade da farmacocinética e farmacodinâmica de drogas habitualmente utilizadas, aumentando a solubilidade e a biodisponibilidade das mesmas (LANGER, 1998; SHI; GUSTAFSON; ANDREW MACKAY, 2014). Evidentemente, se prioriza a utilização de um material que possua características favoráveis frente aos demais sistemas nanoparticulados, neste sentido, destacam-se as nanocápsulas de núcleo lipídico (LNCs) (DE BRUM et al., 2015; DETONI et al., 2012; FIEL et al., 2011). Constituídas por materiais biodegradáveis, as LNCs demonstram ser efetivas ferramentas de entrega de fármacos, não demonstrando toxicidade em ensaios *in vivo* (BULCÃO et al., 2014). Estas nanocápsulas têm sido utilizadas para a entrega de antioxidantes em

diferentes etapas da produção de embriões *in vitro*, e não apresentam citotoxicidade mesmo quando utilizada em altas concentrações na suplementação de meios de cultivo utilizados na PIVE de bovinos (LUCAS et al., 2017; REMIÃO et al., 2016; KOMNINOU et al., 2016).

Portanto, tendo em vista comparar o efeito antioxidante do resveratrol nanoencapsulado suplementado em diferentes concentrações durante a MIV, serão avaliados parâmetros como a taxa de maturação de oócitos, de expansão das células do cumulus, a quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de glutathiona (GSH) nos oócitos maturados *in vitro*.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Determinar o efeito do resveratrol nanoencapsulado em nanocápsulas de núcleo lipídico frente aos processos envolvidos na maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito das nanocapsulas carregadas com resveratrol sob a maturação e a expansão das células do cumulus *in vitro*;
- Avaliar o efeito das nanocápsulas carregadas com resveratrol através de quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e glutathiona (GSH) em oócitos bovinos maturados *in vitro*.

3 Revisão de Literatura

3.1 Gametogênese e foliculogênese

Os oócitos são as células germinativas femininas diferenciadas através de um processo chamado oogênese, a qual ocorre durante o desenvolvimento fetal nos mamíferos (MARION et al 1971; HIRSHFIELD, 1991). A formação dos gametas femininos ocorre simultaneamente ao processo de foliculogênese, onde sucede a formação, o crescimento e a maturação folicular, dando origem aos folículos primordiais e culminando com os folículos em estágio pré-ovulatório (FOOTE et al 1975; SAUMANDE, 1981). Os folículos primordiais portam os oócitos imaturos, cujos núcleos estão improgressivos em primeira divisão meiótica, em estágio denominado vesícula germinativa (Prófase I) (FORTUNE et al., 1994). As etapas que compreendem estas fases são reguladas por hormônios gonadotróficos. Assim, a formação do folículo pré-ovulatório se dá através da ação do hormônio folículo estimulante (FSH), que age sob seu respectivo receptor estimulando a maturação dos folículos de Graaf (KUMAR et al., 1997; DIERICH et al., 1998).

A medida que os oócitos são maturados em resposta aos hormônios gonadotróficos, as células do cumulus secretam ácido hialurônico. Quando este se torna hidratado, preenche os espaços entre as células, tornando-as ampliadas em uma matriz pegajosa e mucificada (EPPIG, 1979; SALUSTRI; YANAGISHITA; HASCALL, 1989; CHEN et al., 1996). Este processo é denominado de expansão das células do cumulus, fazendo-se essencial para que ocorra a ovulação (CHEN; RUSSELL; LARSEN, 1993). Da mesma forma, as células da granulosa que permanecem no folículo após a ovulação, são essenciais, pois em conjunto com as células da teca formam subseqüentemente o corpo lúteo, o qual é responsável pela secreção inicial de progesterona, hormônio que é indispensável para o estabelecimento e manutenção da gestação (EPPIG, 2001).

A competência oocitária está intimamente relacionada com as alterações hormonais e moleculares as quais os oócitos estão propensos, principalmente aqueles

que se encontram em folículos no estágio pré-ovulatório. Tais modificações possuem grande importância para o posterior desenvolvimento embrionário (ASSEY et al 1994; HYTTEL et al 1997). *In vivo*, a elevação dos níveis de hormônio luteinizante (LH) estimula a ovulação do oócito maturo presente no folículo pré-ovulatório (Figura 1). Posteriormente, ocorre a retomada da meiose, sendo este período caracterizado por diversos eventos como a condensação cromossômica, a quebra do envelope nuclear e a formação do primeiro corpúsculo polar (RICHARD; SIRARD, 1996).

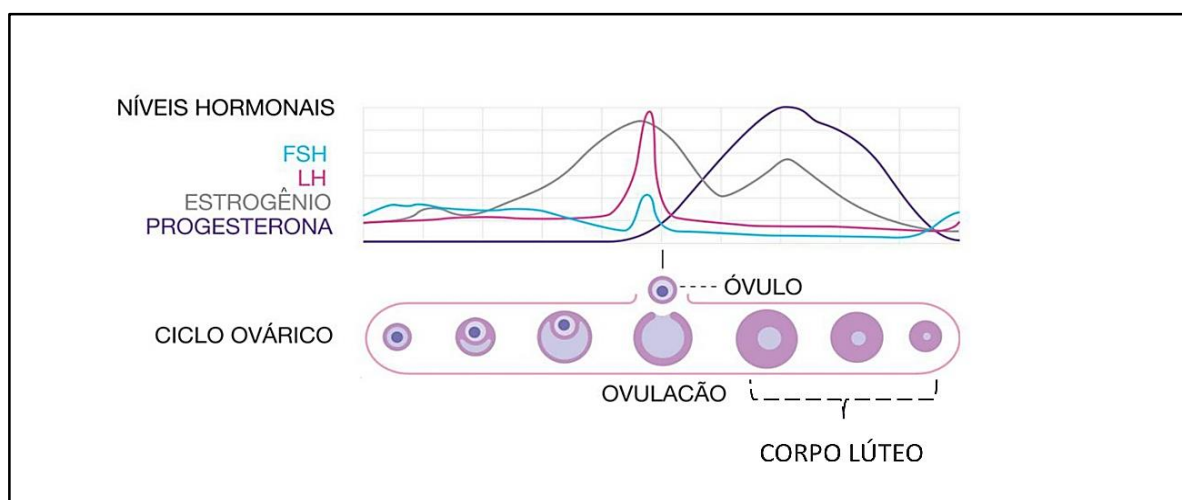


Figura 1. Relação do estágio folicular com os níveis hormonais. O estrogênio inibe a produção de FSH e estimula o aumento da secreção de LH, resultando na ovulação do oócito maturo. Após, há a formação do corpo lúteo o qual secreta os hormônios progesterona e estrogênio, que são fundamentais na manutenção da gestação. Fonte: Adaptado de Wikipédia.

Em contrapartida, os oócitos que são maturados *in vitro*, os quais são recuperados a partir de folículos que ainda não sofreram a ação do LH, retomam espontaneamente a meiose no momento em que os complexos cumulus-oócitos (CCOs) são removidos dos folículos e mantidos em condições adequadas (PINCUS; ENZMANN, 1935). Logo, a retirada dos CCOs do seu microambiente folicular faz com que os fatores inibitórios da maturação produzidos pelas células foliculares não interfiram na retomada da meiose (SIRARD et al 1998).

Inquestionavelmente, o oócito contribui de diversas formas para o desenvolvimento embrionário: com o propósito de supri-lo com as transcritos e

proteínas necessárias, disponibiliza seu citoplasma e material genético para o futuro zigoto (SCHULTZ, 2002). Em síntese, para que o embrião siga seu correto desenvolvimento, torna-se necessário o aporte citoplasmático que é oferecido pelo oócito para a ativação do seu próprio genoma, uma vez que a qualidade oocitária é primordial para o excepcional desenvolvimento inicial do embrião (CAMARGO et al 2006).

3.1.1 Maturação citoplasmática do oócito

A maturação citoplasmática é o processo no qual há uma readequação da estrutura funcional intracitoplasmática do oócito anteriormente ao sinal de ovulação. Ela pode ser distribuída em três principais eventos: Remanejamento das organelas citoplasmáticas, atividade dos filamentos do citoesqueleto e por último, a maturação molecular (FERREIRA et al., 2009). Salienta-se ainda que durante a maturação citoplasmática o oócito cessa o estágio de preparação no qual são sintetizadas as proteínas e os ácidos ribonucleicos (ARNs) de interesse, armazenando-os em seu citoplasma, e conseqüentemente modifica sua maquinaria de transcrição e tradução (HYTTEL et al., 1986; HYTTEL et al., 1988; FAIR et al., 1995).

Próximo ao aumento dos níveis de LH, o oócito reorganiza suas organelas como as mitocôndrias e os grânulos corticais, tornando-as mais abundantes. Esses eventos ocorrem simultaneamente às alterações decorrentes da progressão celular para metáfase (ASSEY et al., 1994). Os grânulos corticais são moléculas que possuem um papel importante no mecanismo de prevenção da polispermia através da reação cortical, que nada mais é que a exocitose do conteúdo presente nestes grânulos (HOSOE et al., 1997). Assim, este mecanismo de controle proporciona uma modificação na matriz extracelular do oócito, em resposta a entrada do espermatozoide no oolema (membrana que circunda o citoplasma do oócito), promovendo modificações nos receptores de espermatozoide na zona pelúcida e conseqüente no endurecimento da mesma (reação de zona) (SUN 2003; HALEY; WESSEL, 2004;). Além disso, durante a maturação citoplasmática também ocorre o acúmulo de moléculas necessárias ao processo de maturação citoplasmática como a glicose, aminoácidos, lipídios, glutatona, as quais preparam o oócito para eventos

pós-fertilização dando suporte para o seguimento do desenvolvimento precoce do embrião até que seu genoma seja ativado (estágio de 8 células em bovinos) e assim sintetize as proteínas necessárias para progredir (DE MATOS et al., 1995; SIRARD et al., 2006; FERREIRA et al., 2009; SUTTON-MCDOWALL et al., 2010). Portanto, denota-se que a maturação molecular e citoplasmática está intimamente correlacionada com a capacidade intrínseca de maturação, desenvolvimento oocitário e posterior progressão do embrião a blastocisto (SIRARD et al., 2006).

3.1.2 Maturação nuclear do oócito

Atualmente, sabe-se que a maturação oocitária é resultante de inúmeras alterações bioquímicas estruturais nucleares e citoplasmáticas fundamentais para o que o oócito torne-se competente para posterior suporte ao desenvolvimento embrionário inicial (BALL et al 1984; ASSEY et al 1994; HYTTEL et al 1997). O microambiente onde estas células estavam dispostas, assim como as concentrações das moléculas acumuladas durante o processo de maturação, são essenciais para promover as cascatas moleculares adequada afim de ativar o genoma embrionário (SIRARD et al 2006).

No decorrer da maturação nuclear, o oócito que está estagnado em Profase I, é induzido pelo fator promotor da maturação (MPF) (SUGIURA et al., 2006) a retomar a meiose e assim verifica-se sucessivos eventos nucleares como a degradação de vesículas germinativas (GVBD), condensação da cromatina, o desaparecimento do núcleo e a fragmentação da membrana nuclear (KUBELKA et al., 1988). Por conseguinte, o oócito progride pelos estágios de: Metáfase I onde corre o alinhamento dos cromossomos homólogos e a formação da placa equatorial, posteriormente, na Anáfase I há a separação das cromátides e divisão longitudinal dos centrômeros, e por fim no estágio de Telófase I, onde há a descondensação parcial das cromátides e a organização da carioteca (MAYES; SIRARD, 2001; BARAHONA; AYALA, 2005).

Estes eventos nucleares são ativados a partir da indução do hormônio LH, visto que após a ativação, o oócito sofre a primeira metáfase e consequente extrusão do primeiro corpúsculo polar, uma vez que após este processo, o oócito fica preso em Metáfase II até ser novamente ativado no decorrer da fertilização, sendo este bloqueio

influenciado pelo fator citostático (CSF) (SIRARD et al., 1989; MAYES; SIRARD,2001; SIRARD et al., 2006). Desta forma, a reativação do oócito dá-se através de mecanismos de sinalização intracelular, como por exemplo, o aumento de cálcio desencadeado pelo espermatozoide no processo de fertilização (MASUI, 2000). Em consequência a elevação dos níveis de cálcio intracelular, o processo de bloqueio é revertido, assim, o CSF é degradado, ativando a formação do pronúcleo e a retomada das divisões celulares (MIYAZAKI; ITO, 2006).

Inúmeros fatores podem interferir no desenvolvimento embrionário causando a interrupção da clivagem celular, e em bovinos, grande parte deste bloqueio embrionário processa-se durante as fases de transição do ciclo celular (MEMILI; FIRST, 2000). Desta maneira, este bloqueio está totalmente interligado com a transcrição materno-embrionária, pelo fato de que os oócitos alojam todos os ácidos ribonucleicos mensageiros (ARNm) e proteínas indispensáveis para o desenvolvimento embrionário, até que o embrião consiga transcrever seu próprio genoma e prossiga a divisão celular (DE SOUSA et al., 1998). Por fim, no decorrer da meiose e mitose, a transmissão fidedigna dos cromossomos é primordial para a conservação e reprodução de todos os organismos vivos, logo, erros durante a disposição dos cromossomos resultam em aneuploidias ou até mesmo na interceptação da gestação (HASSOLD; HUNT, 2001).

3.2 Estresse oxidativo

O oxigênio (O_2) é um componente necessário para dar suporte a viabilidade celular sob condições aeróbicas. Dentre seus produtos metabólitos estão as espécies reativas de oxigênio (EROS) que podem causar danos nocivos às células, modificando algumas de suas funções, inclusive, inviabilizando a sua subsistência, levando-as a processos apoptóticos (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1995). Todavia, é necessário que estes estejam em um equilíbrio contínuo para que sejam mantidas as funções celulares normais, do contrário, as EROs e o estresse oxidativo podem ocasionar danos ao DNA e a membrana celular através da peroxidação lipídica. Da mesma maneira, estes eventos podem alterar padrões de expressão de genes que implicam na interação espermatozoide-oócito (AITKEN, 1987; GONÇALVES, 2010).

O estresse oxidativo, os distúrbios de pH e as toxinas produzidas através de alterações intra e extrafoliculares, influenciam consideravelmente distúrbios

cromossômicos que resultam em aneuploidias durante a maturação oocitária (HANSMANN; PABST, 1992; EICHENLAUB-RITTER et al., 1996; MAILHES et al., 1997). Desta forma, a instabilidade celular endógena e exógena pode ocasionar danos no processo de maturação de oócitos *in vivo* (B. MAILHES et al., 2000) e principalmente na MIV, uma vez que a produção de EROs é significativamente aumentada pela intensa manipulação, exposição a luz, altas concentrações de oxigênio e metabólitos de substratos que não são encontrados *in vivo* no trato reprodutor da fêmea (GUERIN et al., 2001; AGARWAL et al., 2006;).

Em síntese, o estresse oxidativo é definido como um excessivo aumento na produção de EROs, a qual ultrapassa as defesas antioxidantes do corpo, e no decorrer dos tratamentos *in vitro* apresentam forte influência na qualidade embrionária em contraste com os embriões produzidos *in vivo* (AGARWAL et al., 2003; AGARWAL et al., 2006). Os embriões produzidos *in vivo* neutralizam as espécies reativas de oxigênio por intermédio de um eficiente mecanismo de defesa antioxidante, inexistente no ambiente *in vitro* (SIKKA, 2004).

O estresse oxidativo parece ser responsável por numerosos tipos de danos embrionários *in vitro*. EROs tal como o O_2 são capazes de difundir e atravessar a membrana celular e alterar diferentes tipos de moléculas celulares tal como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. As consequências são múltiplas, e inclui alterações mitocondriais, bloqueio do desenvolvimento embrionário, depleções e apoptose (GUERIN, 2001).

3.3 Antioxidantes

Segundo Halliwell e Gutteridge (1989), antioxidantes são definidos como qualquer substância que apresente baixa concentração quando comparada às concentrações de um substrato oxidável, que possua a capacidade de atrasar ou inibir consideravelmente a oxidação deste último. Particularmente, os antioxidantes funcionam como uma proteção celular, atuando em diversos níveis intracelulares, uma vez que estes compostos impedem a formação de radicais livres, capturam os radicais formados, reparam os danos oxidativos causados, eliminam moléculas danificadas e reconhecem as moléculas altamente danificadas a fim de prevenir eventuais mutações (GUTTERIDGE, 1994). Estas defesas são um mecanismo de proteção

contra EROs importante para o desenvolvimento embrionário, visto que há presença de enzimas antioxidantes endógenas em estágios de maturação oocitária em diversas espécies, porém seus padrões de expressão gênica são bastante variáveis como é o caso da comparação entre humanos, bovinos e murinos, refletindo assim na competência de desenvolvimento embrionário tanto *in vivo* como *in vitro* (HARVEY et al., 1995; EL MOUATASSIM et al., 1999).

Fisiologicamente, as estratégias de defesas antioxidantes podem ser estabelecidas por compostos enzimáticos, como também por compostos não enzimáticos (SIES, 1997). Dentre as principais classes de enzimas antioxidantes estão as peroxidases de superóxido dismutases (SOD), as catalases (CAT) e a glutatona (GSH), ademais, existem diversas enzimas que auxiliam neste processo e reagem com compostos oxidantes produzidos pelo estresse oxidativo (SIES, 1997). Da mesma forma, os compostos antioxidantes não enzimáticos contribuem com a redução dos níveis de radicais oxidantes, reduzindo-os e dificultando os processos oxidativos (BUETTNER, 1993), assim, destacam-se nesta classe de antioxidantes a vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ascorbato), vitamina A, taurina, piruvato e hipotaurina (SIKKA, 2004).

Contudo, durante o processo de produção *in vitro* de embriões é de suma importância que os oócitos maturados *in vitro* e os subsequentes embriões estejam protegidos de prováveis danos oxidativos. Portanto, os meios de cultura *in vitro* são constantemente suplementados com diversos compostos, principalmente, compostos quelantes de metais e antioxidantes, assim, fornecendo o aporte nutritivo necessário para viabilidade embrionária (IWATA et al., 1998). Em vista disso, é essencial que este meio de cultura dispunha de um significativo potencial redox para limitar o processo de peroxidação, permitindo o progresso dos presumíveis embriões (GUERIN et al., 2001).

Na literatura, é descrito que diversos compostos antioxidantes são utilizados na PIVE a fim de elucidar os mecanismos reprodutivos e moleculares que estão correlacionados a maturação de oócitos e ao desenvolvimento embrionário de inúmeras espécies (HYUN et al., 2012; KHAZAEI; AGHAZ, 2017). Dentre os antioxidantes utilizados estão o β -mercaptoetanol (β -ME), a cisteína (DE MATOS; FURNUS, 2000), a cisteamina (KOBAYASHI et al., 2006), as antocianinas (YOU et

al., 2010) e a melatonina (WANG et al., 2013). Salienta-se ainda que o resveratrol mostra-se um competente antioxidante para a suplementação de meios de cultura na reprodução de mamíferos, desta forma, numerosos estudos vêm sendo conduzidos buscando constatar a função e atividade biológica deste composto *in vitro*. (KWAK et al 2012; HUANG et al 2013; WANG et al 2014).

3.3.1 Resveratrol

O resveratrol (trans-3,5,4'- Trihydroxystilbene) é um polifenol natural encontrado em diversas plantas e alimentos como o amendoim e principalmente em sementes de uvas (JANG et al., 1997). Este composto foi primeiramente isolado na década de 1940, de uma raiz chamada de *Polygonum cuspidatum*, a qual é amplamente utilizada e valorizada na medicina tradicional chinesa e japonesa (VASTANO et al., 2000; AGGARWAL et al., 2004). Conforme Soleas e colaboradores (1997), a principal função biológica do resveratrol é proteger a planta de agentes patogênicos como fungos ou condições inapropriadas que gerem estresse.

É relevante destacar que diversos estudos comprovaram que o resveratrol é um importante composto natural, o qual possui uma variedade de ações biológicas favoráveis, como por exemplo, seu efeito antiinflamatório e antioxidante (PERVAIZ; HOLME, 2009), assim como, seu potencial efeito de propiciar proteção cardiovascular (SZMITKO; VERMA, 2005), prevenção contra o câncer (JANG et al., 1997) e diabetes (PALSAMY; SUBRAMANIAN, 2008). Ele também demonstra efeito antiapoptótico (JANG; SURH, 2001), neuroprotetor (KARUPPAGOUNDER et al., 2009) e antiviral (DOCHERTY et al., 2006). Além disso, é visto que o resveratrol intensifica a atividade do gene SIRT. Este gene codifica as proteínas sirtuínas, também conhecidas como desacetilases dependentes de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD⁺).

O SIRT é fundamental para a sobrevivência celular, pois suas interações com outros genes específicos, ocasiona melhorias relacionadas ao aumento da longevidade e resistência celular, além de ser essencial no controle da função mitocondrial e na biogênese celular. (HOWITZ et al., 2003; CANTO et al., 2012; KANG; HWANG, 2009).

Ademais, no que diz respeito aos efeitos biológicos do resveratrol na reprodução de mamíferos, de acordo com Takeo et al. (2013), por intermédio da suplementação do meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos com resveratrol, observa-se a ampliação da expressão proteica de SIRT1, com conseqüente, melhora nos resultados de fertilização *in vitro*, uma vez que a inibição deste gene aumentou a taxa de fertilização irregular. Da mesma forma, estudos relatam que a ativação da SIRT1 gerada pelo resveratrol otimiza a função mitocondrial, diminuindo a prevalência de processos bioquímicos relacionados com a disfunção desta organela, como por exemplo a geração de EROs (WESTPHAL; DIPP; GUARENTE, 2007; OUTEIRO; MARQUES; KAZANTSEV, 2008; ALCAÍN; VILLALBA, 2009). Ainda, segundo Abdel-Wahab et al. (2012), a adição do composto no meio de cultura de embriões *in vitro* proporciona melhorias na qualidade embrionária, reduzindo os riscos de danos que os tornem inviáveis e assim, aumentando a resistência dos mesmos durante o processo de criopreservação. Constata-se que o resveratrol possui duas conformações estruturais isoméricas: cis-(Z) e trans- (E) (figura 2), onde seu isômero trans é biologicamente mais ativo e permanece nesta conformação se não for exposto à luz UV. Quando esta incidência ocorre, a molécula toma a conformação cis, que é classificada como instável, não possui atividade biológica e nem é comercializável (BASLY et al., 2000; CHEN et al., 2007 FULDA, 2010; RIUS et al., 2010).

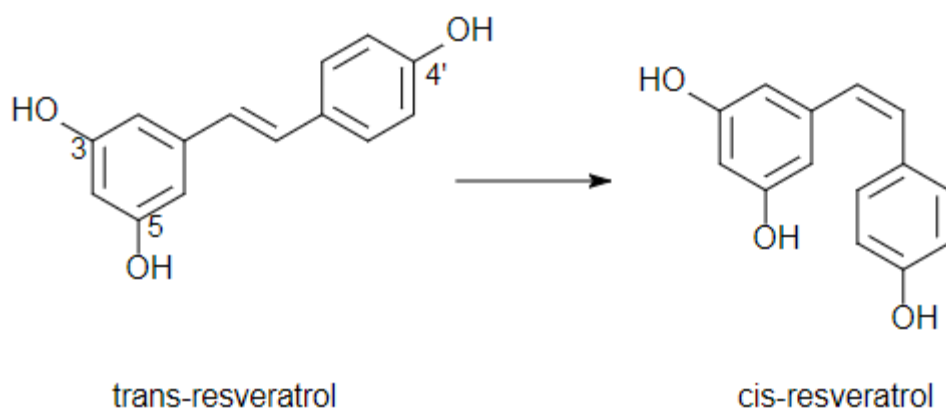


Figura 2. Estrutura química do resveratrol. Conformação trans-(E) e cis-(Z). (Extraído de: AMRI et al., 2012).

O fato de ser um composto extremamente fotossensível, gera instabilidade. Foi constatado por Vian et al. (2005), que 80 a 90% do composto trans-resveratrol em solução sofreu um processo de isomerização quando foi exposta à luz durante 1 h, convertendo-se a isoforma cis-resveratrol. Por esse motivo, grupos de pesquisa buscam desenvolver pesquisas que auxiliem no desenvolvimento de novas alternativas que aumentem o potencial terapêutico do resveratrol e sua biodisponibilidade. A fim de ter suas propriedades mantidas, a utilização da nanotecnologia poderá ser uma estratégia para esta problemática (NDIAYE; KUMAR; AHMAD, 2011; AMRI et al., 2012).

3.4 Nanocápsulas de núcleo lipídico

Durante a década de 1950, as pesquisas voltadas para o potencial das estruturas submicrométricas já eram reconhecidas (FEYNMAN, 1960). Porém, o desenvolvimento exponencial da nanotecnologia aplicada só foi observado na década de 1990, após a invenção de novas tecnologias de microscopia, como por exemplo a microscopia de força atômica que permite a visualização e a manipulação de materiais em pequena escala (BINNIG; QUATE; GERBER, 1986). Atualmente, a utilização da nanotecnologia se diversifica em inúmeros âmbitos, sendo extensivamente aplicada ao desenvolvimento de metodologias biomédicas, como na detecção de agentes biológicos, na administração de medicamentos, no diagnóstico de doenças por

imagem, até mesmo na engenharia de tecidos (EMERICH, 2005).

Os nanomateriais possuem características funcionais em dimensões nanométricas, com diâmetro médio de tamanho das partículas menor ou igual que 100 nm, os quais mostram-se extremamente importantes e aplicáveis em diversas áreas da pesquisa, possibilitando a geração de novos sistemas de liberação de drogas (FERRY; GOODNICK, 1997; SARIKAYA et al., 2003; WANG et al., 2014). Estes sistemas de liberação controlada de fármacos são projetados a fim de reduzir a toxicidade de moléculas e medicamentos, assim, proporcionando uma melhora na eficácia da farmacocinética e farmacodinâmica de drogas rotineiramente utilizadas, aumentando a solubilidade e a biodisponibilidade das mesmas (LANGER, 1998; SHI; GUSTAFSON; ANDREW MACKAY, 2014).

É evidenciado através de diversos estudos que a utilização de nanocápsulas de núcleo lipídico (LNCs) mostra-se favorável frente aos demais sistemas nanoparticulados (FIEL et al., 2011; DE BRUM et al., 2015; DETONI et al., 2012). As LNCs são definidas como uma estrutura híbrida entre as nanocápsulas poliméricas e os lipossomas, onde diferencialmente dos lipossomas, as LNCs são preparadas por uma metodologia de energia mais amena sem solvente, garantindo desta forma, superior estabilidade (HUYNH et al., 2009).

Ainda, as LNCs possuem em seu núcleo uma composição de monoestearato de sorbitano disperso em triglicerídeo cáprico / caprílico e também uma estrutura polimérica de poli (ϵ -Caprolactona) a qual dá-se configuração física a nanocápsula (POHLMANN et al., 2013; BENDER et al., 2014; CORADINI et al., 2015; DE BRUM et al., 2015). Além de ser uma eficiente ferramenta biodegradável de entrega de fármacos, as LNCs não apresentaram toxicidade em ensaios *in vivo* (BULCÃO et al., 2014). No que diz respeito às ciências reprodutivas, recentemente foi comprovado por Lucas et al. (2017) que a aplicabilidade de LNCs em altas doses na suplementação de meio MIV de oócitos bovinos, não demonstra toxicidade ao desenvolvimento dos embriões bovinos produzidos *in vitro*. Além disso, foi evidenciado pelo nosso grupo de pesquisa que mesmo sem a presença de suplementos, as LNCs apresentam efeitos benéficos durante a produção *in vitro* de embriões bovinos, resultando na diminuição da produção de EROs (LUCAS et al., 2015; REMIÃO et al., 2016; KOMNINOU et al., 2016). Em suma, diversos estudos demonstram que a utilização da nanotecnologia

como material suporte para a estabilização do resveratrol tem sido amplamente empregada, assim, pesquisas visam novas formulações de nanocápsulas que auxiliem no processo de biodisponibilidade, proteção contra degradação, aumento da solubilidade e direcionamento do resveratrol (AMRI et al., 2012), com o intuito de tornar mais acessível a sua aplicação e comercialização.

Neste contexto, para unificar estratégias favoráveis frente as adversidades encontradas na produção *in vitro* de embriões bovinos, a suplementação do meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos com o antioxidante resveratrol nanoencapsulado em nanocápsulas de núcleo lipídico pode ser uma alternativa promissora.

4 Metodologia

O presente estudo foi realizado durante o período de agosto a outubro de 2017 no Laboratório de Biotecnologia do Câncer, situado no Campus Capão do Leão, o qual pertence ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

4.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes químicos e soluções utilizados a fim de desenvolver este estudo foram comprados pela Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA), exceto os que estão especificado na sequência.

4.2 Preparação das nanocápsulas de núcleo lipídico (LNCs)

O processo de preparação das LNCs deu-se através do método de deposição interfacial de polímero pré-formado (JÄGER et al., 2009; VENTURINI et al., 2011). A partir de uma fase orgânica (24mL de acetona, 3,0mL de etanol) contendo o polímero de poli (ϵ -caprolactona) biodegradável (PCL; Aldrich, Stras-bourg, França), monoestearato de sorbitano (0,038g) e cáprico-caprílico (0,157g) em agitação constante a 40°C até total dissolução de todos os componentes. Assim, foi obtida uma solução turva pela inserção desta fase orgânica em uma fase aquosa (54mL de água e 0,077g de polissorbato 80), em seguida, após 10 minutos, a água foi parcialmente evaporada sob pressão reduzida em 40°C, o solvente orgânico foi totalmente eliminado e o volume final ajustado para 10ml. O processo de preparação das nanocápsulas de resveratrol procedeu-se de maneira semelhante, onde o composto é adicionado juntamente com o polímero de poli (ϵ -caprolactona) biodegradável (PCL; Aldrich, Stras-bourg, França), monoestearato de sorbitano (0,038g) e capricílico-caprílico (0,157g) na fase orgânica. Durante o processo de formulação, preparação e armazenagem das nanocápsulas, todos os compostos foram protegidos da luz.

4.2.1 Caracterização das Nanocápsulas

A determinação do tamanho em nano escala das partículas foi realizada por difração a laser (LD) (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra), onde a caracterização físico-química foi avaliada através dos seguintes parâmetros: distribuição de tamanho de partícula, tamanho médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH. Deste modo, as análises de tamanho da partícula (diâmetro médio Z), índice de polidispersidade (PDI) e o potencial zeta foram determinados utilizando o sistema Zetasizer® (Nano-ZS ZEN 3600 modelo®, Malvern, Reino Unido). Ainda, as nanocapsulas foram diluídas (500x) em água ultrapura para determinação de tamanho de partícula e PDI, ou em solução aquosa de NaC₆H₅CO₂ 10mM para determinar o potencial zeta. A determinação de medidas de pH foi determinada através da utilização de um potenciômetro calibrado (DM-22, Digimed, Brasil) diretamente nas amostras.

4.3 Coleta dos ovários e classificação oocitária

Os ovários bovinos utilizados durante este experimento foram provenientes de um abatedouro local. Após a coleta, foram armazenados em um recipiente térmico (+/- 30°C) e transportados até o laboratório. Ao chegar no laboratório, a temperatura destes ovários foi mensurada e posteriormente realizada a assepsia com solução salina a 0,9% previamente aquecida. Os folículos entre 2 e 8mm foram puncionados utilizando agulha acoplada a uma bomba de sucção a vácuo (Figura 3).

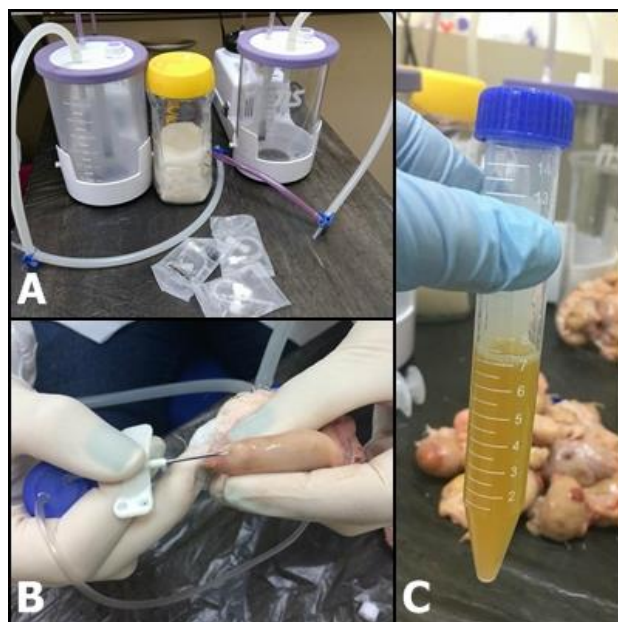


Figura 3. Sistema de punção de ovários. (A) Bomba de sucção a vácuo, equipamento utilizado para punccionar os ovários; (B) Punção dos folículos com auxílio de agulha acoplada a um tubo cônico de 15 ml; (C) Líquido folicular. Fonte: Arquivo pessoal.

O líquido puncionado foi mantido em tubo cônico a 35°C, e após centrifugação a 700rpm (rotação por minuto) e remoção do *pellet* formado para uma placa de petri, o sobrenadante foi lavado com PBS (*phosphate buffer saline*) e filtrado com ajuda de filtro coletor de embriões (Nutricell, Campinas, São Paulo, Brasil). Em seguida, com o auxílio de uma lupa estereomicroscópica, foram selecionados somente os CCOs considerados como grau 1, classificados desta maneira por possuírem o citoplasma homogêneo e no mínimo três camadas de células do cumulus compactas.

4.4 Maturação *in vitro* (MIV)

Os CCOs selecionados foram primeiramente lavados em meio de lavagem (In Vitro Brasil S/A, São Paulo, Brasil), e subsequentemente distribuídos em 8 grupos contendo de 15 a 20 estruturas, dispostos em gotas 100µl de meio MIV (In Vitro Brasil S/A, São Paulo, Brasil). Por conseguinte, os grupos foram identificados por: Resveratol livre 2µM, 1µM e 0,5µM; Resveratrol nanoencapsulado 2µM, 1µM e 0,5µM;

Nanocápsula Branca (LNC) 2 μ M e um grupo controle sem tratamento. Estes grupos foram suplementados com os respectivos tratamentos e concentrações, as quais foram estimadas através do método de diluição seriada a partir da maior concentração do referente grupo. Logo após, os CCOs foram encubados de 22 a 24 horas em uma atmosfera controlada com 5% de CO₂ a 38,5°C para retomar o processo de maturação nuclear e citoplasmática.

4.5 Avaliação da expansão das células do cumulus

A avaliação de expansão das células do cumulus foi realizada após 24 horas de maturação conforme descrito por Marei et al. (2010), onde as células foram classificadas como não expandidas, parcialmente expandidas e totalmente expandidas (Figura 4). A análise foi feita com um microscópio invertido IX 71 (Olympus Co.), e as imagens foram obtidas com o auxílio da câmera digital DP72 (Olympus Corporation, Shinjuku-ku, Tóquio, Japão) a qual é acoplada ao mesmo.

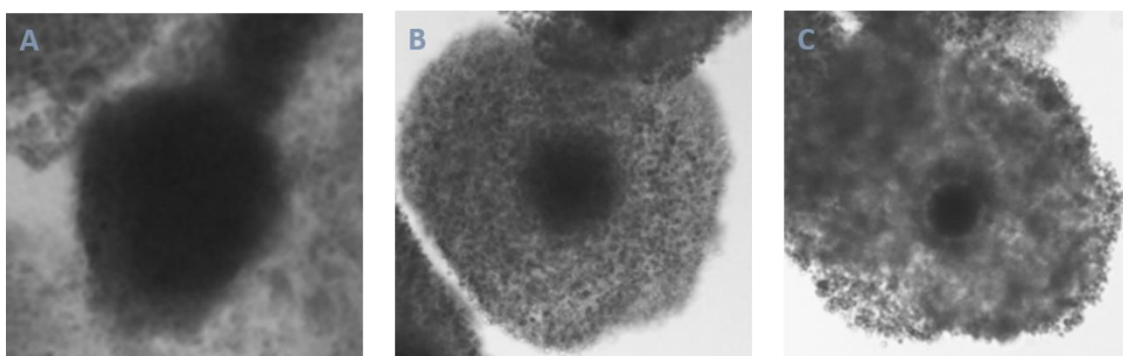


Figura 4. Avaliação da expansão das células do cumulus. (A) Oócito com células do cumulus compactadas não expandidas, (B) oócito com as células do cumulus levemente afrouxadas e parcialmente expandidas, (C) oócito com as as células do cumulus afrouxadas e totalmente expandidas. Fonte: Arquivo pessoal.

4.6 Avaliação da maturação nuclear

Posteriormente a avaliação de expansão das células do cumulus, cada grupo contendo de 15 a 20 estruturas foi lavado em uma gota de 70 μ L de solução PBS-polivinilpirrolidona (PVP) e desnudados através de sucessivas pipetagens em uma gota de 70 μ L de hialuronidase (160UI/ml). Na sequência, os oócitos desnudos foram lavados em três gotas de solução PBS-PVP, e em seguida, foram dispostos em uma

gota contendo 90µL de corante Hoechst 33342 (10µg/ml), onde permaneceram em contato com o mesmo durante 30 minutos em uma temperatura de 37°C no escuro. Após o tempo previsto, as estruturas foram lavadas novamente em PBS-PVP, com o intuito de remover o excesso do corante utilizado. A maturação nuclear foi determinada através da avaliação da presença do primeiro corpúsculo polar, desta forma, foram analisadas separadamente cada estrutura utilizando um microscópio invertido com fluorescência IX 71 (Olympus Co.) com filtro ultravioleta (UV) em uma faixa de 330-385 nanômetros (nm).

A avaliação dos perfis de coloração deu-se conforme descrito por Van Woudenberg et al. (2012), onde os perfis com um ponto fluorescente indicaram um oócito imaturo, ou seja, em metáfase I (MI), com dois pontos fluorescentes indicaram um oócito maturado em metáfase II (MII). Já os perfis com grânulos no citoplasma e um número indefinido de pontos fluorescentes, indicaram oócitos degenerados e os perfis que apresentavam fluorescência com acromatina difusa ou ligeiramente condensada indicaram um oócito em estágio de vesícula germinativa (VG).

4.7 Mensuração dos níveis de EROs e GSH

A mensuração dos níveis de EROs e GSH foi realizada após a MIV, onde primeiramente os CCOs foram desnudados através de sucessivas pipetagens em uma gota de 70µL contendo hialuronidase (160UI/ml) e posteriormente estas estruturas foram lavadas em três gotas de solução PBS-PVP. As concentrações dos corantes diacetato de 2', 7'-diclorodi-hidrofluoresceína (DCHFDA) para medir os níveis de EROs e 4-clorometil-6,8-difluoro-7-hidroxicumarina (CellTracker Blue CMF2HC Molecular Probes; Beyotime Instituto de Biotecnologia) para medir os níveis de GSH, foram ajustadas de acordo com a metodologia descrita por Wang et al. (2014). Em seguida, foi adicionado 25µL de DCHFDA e 1,23µL de CellTracker Blue em uma alíquota contendo 473,77µL de PBS-PVP. Foi utilizado 100µL do conteúdo desta alíquota, em uma gota, onde os oócitos ficaram incubados no escuro durante 30 minutos. Posteriormente, os oócitos foram lavados em três gotas de 70µL de PBS-PVP e distribuídos em gotas da mesma solução a fim de avaliar as emissões de fluorescência. As imagens obtidas foram registradas utilizando uma câmera digital DP-72 (Olympus Corporation, Shinjuku-ku, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio fluorescente invertido (IX 71; Olympus, Tóquio, Japão) e equipados com filtros UV de

450-490nm para EROs e 330-395nm para GSH . A fluorescência foi analisada através da intensidade do pixel usando o software Cell[^]F (Olympus SIS-Soft Imaging Solutions, Münster, Renânia do Norte-Westphalia, Alemanha).

4.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste Qui-quadrado para avaliar a maturação oocitária e expansão das células do cumulus. A mensuração dos níveis de EROs e GSH foram calculados pelo one-way ANOVA seguido pelo teste de Kruskal-Wallis. O grau de significância estatística em todas as análises foi definido em um nível de probabilidade de $p < 0.05$.

5 Resultados

5.1 Expansão das células do cumulus

Os resultados demonstram que através da metodologia de análise de expansão das células do cumulus, foi observado no grupo controle, onde obtivemos um número total de 38 estruturas, uma taxa percentual de 86,8% de expansão parcial, 7,9% de células não expandidas e 5,3% de células totalmente expandidas. O grupo que recebeu o tratamento de 2 μ M de LNCs sem composto carregado, em um total de 29 estruturas avaliadas, 79,3% obtiveram expansão parcial e 20,7% estavam totalmente expandidas. O grupo tratado com resveratrol livre na concentração de 0,5 μ M, onde foram avaliadas 29 estruturas, destas, 82,8% demonstraram uma expansão parcial e 17,2% estavam totalmente expandidas. Já nas concentrações de 1 μ M com 30 estruturas avaliadas e 2 μ M com 31 estruturas avaliadas, foi observada expansão parcial em 86,7% e 74,2%, e expansão total em 13,3% e 25,8%, respectivamente.

No grupo tratado com resveratrol nanoencapsulado na concentração de 0,5 μ M, foram avaliadas 39 estruturas, das quais, 82,1% estavam parcialmente expandidas, 12,8% possuíam total expansão e 5,1% não possuíam expansão das células do cumulus. Dando continuidade aos resultados do tratamento com resveratrol nanoencapsulado, o grupo tratado com 1 μ M no qual foram avaliadas 32 estruturas, um percentual de 81,2% demonstrou expansão parcial e 18,8% estavam totalmente expandidas. Por fim, o grupo que foi tratado com 2 μ M de resveratrol nanoencapsulado onde foram avaliadas 23 estruturas, 82,6% apresentavam parcial expansão e 17,4% estavam totalmente expandidas.

Dos resultados aqui apresentados, foram descritos os grupos que obtiveram a avaliação de um percentual de “não expansão” das células do cumulus, somente os grupos controle e resveratrol nanoencapsulado a 0,5 μ M. Aos demais tratamentos, este resultado não foi observado.

5.2 Maturação nuclear

Os resultados obtidos através da avaliação dos perfis de maturação nuclear demonstram que no grupo controle, das 40 estruturas avaliadas, 75% atingiram maturação nuclear. No grupo tratado com de 2 μ M de LNCs sem composto carreado, das 32 estruturas avaliadas, 81,2% foram classificadas como oócitos maturados.

O tratamento com resveratrol livre na concentração de 0,5 μ M, das 25 estruturas avaliadas, 72% foram classificados como oócitos maturados; na de 1 μ M, das 26 estruturas, 88,5% foram classificados como oócitos maturados; já na concentração de 2 μ M, das 33 estruturas, 90,9% dos oócitos foram classificados como maturados.

Os grupos tratados com resveratrol nanoencapsulado, na concentração de 0,5 μ M, das 41 estruturas avaliadas, 80,5% foram classificados como oócitos maduros; na concentração de 1 μ M, das 29 estruturas, 75,9%; e na concentração de 2 μ M, das 26 estruturas avaliadas, 76,9%.

5.3 Níveis de EROs e GSH

Na avaliação dos níveis de EROs foi observado que o resveratrol livre (todas as concentrações) e o resveratrol nanoencapsulado na concentração de 1 μ M diminuiu os níveis de EROs quando comparados ao grupo LNCs 2 μ M. Nos grupos Controle, LNCs 2 μ M, resveratrol nanoencapsulado nas concentrações de 0,5 μ M e 2 μ M, não foram vistas diferenças estatísticas sobre esse parâmetro, quando comparados aos demais grupos testados (Tabela 1).

Em relação a mensuração dos níveis de GSH, quando os oócitos são expostos as diferentes concentrações de resveratrol livre e também resveratrol nanoencapsulado, há um aumento significativo nos níveis de produção de GSH em relação ao controle e ao tratamento com LNCs 2 μ M.

Tabela 1: Mensuração dos níveis de EROs e GSH após a MIV de oócitos bovinos suplementada com os diferentes tratamentos experimentais.

Grupos experimentais	Níveis de EROs	Níveis de GSH
Controle	80,71 (\pm 4,52) ab	35,77 (\pm 4,93) a
LNC 2 μ M	90,73 (\pm 3,36) a	32,71 (\pm 3,32) a
Res 0.5 μ M	64,00 (\pm 3,26) b	54,10 (\pm 9,73) b
Res 1 μ M	66,88 (\pm 5,17) b	56,29 (\pm 11,29) b
Res 2 μ M	66,80 (\pm 5,37) b	68,60 (\pm 10,79) b
Res-LNC 0.5 μ M	78,95 (\pm 2,88) ab	60,60 (\pm 11,65) b
Res-LNC 1 μ M	69,58 (\pm 2,55) b	56,13 (\pm 10,36) b
Res-LNC 2 μ M	77,39 (\pm 4,35) ab	49,01 (\pm 12,11) b

Legenda: LNC – Nanocápsulas de Núcleo Lipídico; Res – Resveratrol em sua forma livre; Res-LNC – Resvetrol nanoencapsulado. Letras diferentes entre colunas significam diferença estatística ($p < 0,05$).

6 Discussão

Neste trabalho é proposta a utilização de resveratrol nanoencapsulado para a suplementação de meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos. A maturação oocitária advém através da ação dos hormônios gonadotróficos, e *in vitro* pode ser observada por um notável marcador, que é a expansão das células do cumulus (CHEN et al., 1990). A expansão das células do cumulus foi avaliada como um modelo de teste de citotoxicidade, visto que Marei et al. (2010) descreve que a inibição da expansão celular durante o processo de maturação oocitária *in vitro* contribui de forma insatisfatória com a redução do potencial desenvolvimento e competência dos oócitos. Os resultados analisados indicam que o protocolo de suplementação do meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos proposto não alterou as taxas de expansão de células do cumulus, o que corrobora com um trabalho que já havia descrito esse efeito para nanocápsulas de núcleo lipídico em meio de maturação *in vitro* (LUCAS et al. 2017)

Outros trabalhos também já demonstraram que as LNCs não possuem citotoxicidade frente a oócitos e embriões. Lucas et al. (2015 e 2017), em seus estudos constatou que a suplementação do meio de MIV de oócitos bovinos utilizando altas concentrações de LNCs sem carrear nenhum composto, não provocou efeito tóxico no desenvolvimento e na qualidade de embriões, ao contrário, gerou níveis mais baixos de produção de EROs nestas estruturas. Bem como o trabalho fundamentado por Remião et al. (2016), no qual os efeitos da suplementação de melatonina nanoencapsulada em LNCs demonstrou efetivamente melhorar a eficiência da maturação *in vitro* de oócitos bovinos, uma vez que o tratamento com o composto carregado por LNCs foi superior em relação a qualidade do embrião e a expressão gênica quando comparado ao tratamento com o composto em sua forma livre. Assim como, os resultados obtidos por Komninou et al. (2016), onde foi relatado que a utilização de LNCs carregando melatonina se fez mais eficiente quando comparada a de nanocápsulas poliméricas, aumentando os efeitos protetores contra o estresse oxidativo durante a CIV de embriões bovinos. Ainda, Bulcão et al. (2014) comprovou que as LNCs não apresentam toxicidade através de testes *in vivo* de administração

intradérmica em murinos, demonstrando que as LNCs possuem promissora aplicação para melhorar a entrega de fármacos.

Segundo Van Woudenberg et al. (2012), os ensaios de maturação *in vitro* de oócitos bovinos são uma potencial ferramenta reprodutiva de investigação toxicológica por possuírem alta sensibilidade para identificar compostos químicos que possam ser danosos a fertilidade feminina. Conforme os dados obtidos através da análise de maturação nuclear, foi observado que os grupos experimentais controle, resveratrol livre, resveratrol nanoencapsulado e LNCs, nas distintas concentrações empregues, obtiveram uma taxa superior a 70% de maturação nuclear. Desta forma, demonstrando que o aporte necessário para a maturação nuclear foi estabelecido, particularmente, pelo fato de que o progresso da maturação nuclear é denotado quando o oócito está apto para proceder a fertilização e consecutivo o desenvolvimento embrionário, ou seja, em metáfase II (DADARWAL et al., 2015). No entanto, podemos observar que não houve diferença significativa na taxa de maturação nuclear entre os grupos experimentais.

Referente a equivalência dos efeitos do grupo controle em comparação ao tratamento com LNCs, resultados similares foram encontrados por Remião et al. (2016), no estudo em questão, o meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos era suplementado com LNCs. Do mesmo modo, quando comparado os grupos controle e resveratrol livre, similarmente, não foram constatadas diferenças estatísticas. Resultado análogo aos estudos que investigaram o efeito da suplementação de meio de maturação *in vitro* de oócito bovinos e suínos com resveratrol livre (ITAMI et al., 2015; MA et al., 2015; SOVERNIGO et al., 2017;)

Em relação à produção de EROs, Kwak e colaboradores (2012) descreve que o tratamento de oócitos porcinos com 2 μ M reduziu significativamente as taxas de produção, além de aumentar a concentração de GSH nos oócitos submetidos a maturação com o composto, e subseqüentemente, estes melhoraram o desenvolvimento embrionário reduzindo a expressão de genes apoptóticos. Os nossos resultados são concordantes com o uso do resveratrol em sua forma livre nas concentrações que testadas e na sua forma nanoencapsulada 1 μ M, constatando a sua atividade antioxidante com a eliminação de EROs (MAHAL; MUKHERJEE, 2006). Em relação aos níveis de GSH, a elevação na concentração deste antioxidante

intracelularmente é de suma importância pois ele é fundamental no processo de manutenção celular da homeostase redox, atuando como um desintoxicante natural de compostos químicos estranhos ao sistema biológico (MEISTER, 1992; HAYES et al., 2005). Como visto em nossos resultados, tanto o resveratrol nanoencapsulado quanto o resveratrol em sua forma livre aumentaram significativamente os níveis de produção de GSH em comparação ao controle e ao grupo tratado com LNCs 2 μ M.

Os resultados obtidos no presente trabalho comprovam que a adição do resveratrol nanoencapsulado em LNCs na maturação *in vitro* de oócitos bovinos, frente as análises realizadas, não apresenta toxicidade aos oócitos. Os resultados encontrados em relação ao resveratrol livre corroboram com diversos estudos.

7 Conclusão e perspectivas

Conclui-se que, a adição de resveratrol nanoencapsulado em nanocápsulas de núcleo lipídico na maturação *in vitro* de oócitos bovinos, não apresentaram toxicidade frente as análises realizadas neste trabalho. Em comparação com o controle e as LNCs vazias, há um aumento significativo nos níveis de produção de GSH. Na concentração de 1 μM , também é observada uma diminuição das taxas de EROs. No entanto, não é observada diferença estatística entre os tratamentos com resveratrol livre e resveratrol nanoencapsulado, nos demais parâmetros testados.

A fim de investigar outros efeitos em relação à atividade do resveratrol nanoencapsulado em LNCs, visamos realizar posteriores ensaios averiguando os efeitos relacionado ao desenvolvimento embrionário, bem como a suplementação de outras etapas da produção *in vitro* de embriões bovinos.

Referências

ABDEL-WAHAB, A. M. et al. 132 Resveratrol during in vitro culture improves cryotolerance of in vitro produced bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 1, p. 213-214, 2012.

AGARWAL, Ashok et al. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. **Fertility and sterility**, v. 86, n. 3, p. 503-512, 2006.

AGARWAL, Ashok et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 10, n. 1, p. 49, 2012.

AGARWAL, Ashok; SALEH, Ramadan A.; BEDAIWY, Mohamed A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and sterility**, v. 79, n. 4, p. 829-843, 2003.

AGGARWAL, Bharat B. et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. **Anticancer research**, v. 24, n. 5A, p. 2783-2840, 2004.

AITKEN, R. John; CLARKSON, Jane S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, n. 2, p. 459-469, 1987.

ALCAÍN, Francisco J.; VILLALBA, José M. Sirtuin activators. **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 19, n. 4, p. 403-414, 2009.

AMRI, A. et al. Administration of resveratrol: what formulation solutions to bioavailability limitations?. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 2, p. 182-193, 2012.

ASSEY, R. J. et al. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. **Molecular reproduction and development**, v. 37, n. 3, p. 335-344, 1994.

ASSEY, R. J. et al. Oocyte structure and follicular steroid concentrations in superovulated versus unstimulated heifers. **Molecular reproduction and development**, v. 39, n. 1, p. 8-16, 1994.

B. MAILHES, John et al. Sensitivity of mouse oocytes to nicotine-induced perturbations during oocyte meiotic maturation and aneuploidy in vivo and in vitro. **Molecular human reproduction**, v. 6, n. 3, p. 232-237, 2000.

BALL, G. D. et al. Symposium: embryo development and manipulation. Maturation and fertilization of bovine oocytes in vitro. **Journal of dairy science**, v. 67, n. 11, p. 2775-2785, 1984.

BASLY, Jean-Philippe et al. Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)-and (Z)-resveratrol. **Life sciences**, v. 66, n. 9, p. 769-777, 2000.

BENDER, Eduardo A. et al. New strategy to surface functionalization of polymeric nanoparticles: one-pot synthesis of scFv anti-LDL (-)-functionalized nanocapsules. **Pharmaceutical research**, v. 31, n. 11, p. 2975-2987, 2014.

BINNIG, Gerd; QUATE, Calvin F.; GERBER, Ch. Atomic force microscope. **Physical review letters**, v. 56, n. 9, p. 930, 1986.

BRACKETT, B.G.; ZUELKE, K.A. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.39, p.43-64, 1993.

BUETTNER, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 2, p. 535-543, 1993.

BULCÃO, Rachel P. et al. In vivo toxicological evaluation of polymeric nanocapsules after intradermal administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 2, p. 167-177, 2014.

CAMARGO, Luiz Sérgio de Almeida et al. Factors influencing in vitro embryo production. **Anim. Reprod**, v. 3, n. 1, p. 19-28, 2006.

CANTÓ, Carles et al. The NAD⁺ precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. **Cell metabolism**, v. 15, n. 6, p. 838-847, 2012.

CHEN, L.; RUSSELL, P. T.; LARSEN, W. J. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. **Molecular reproduction and development**, v. 34, n. 1, p. 87-93, 1993.

CHEN, Lin et al. Covalent linkage between proteins of the inter- α -inhibitor family and hyaluronic acid is mediated by a factor produced by granulosa cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 32, p. 19409-19414, 1996.

CHEN, Lin et al. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. **Molecular reproduction and development**, v. 26, n. 3, p. 236-247, 1990.

CHEN, Xijing et al. Stereospecific determination of cis-and trans-resveratrol in rat plasma by HPLC: application to pharmacokinetic studies. **Biomedical chromatography**, v. 21, n. 3, p. 257-265, 2007.

CORADINI, Karine et al. A novel approach to arthritis treatment based on resveratrol and curcumin co-encapsulated in lipid-core nanocapsules: in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, p. 163-170, 2015.

DADARWAL, D. et al. Effect of superstimulation protocols on nuclear maturation and distribution of lipid droplets in bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 8, p. 1137-1146, 2015.

DALVIT, G. C. et al. Reactive oxygen species in bovine embryo in vitro production. **Biocell**, v. 29, n. 2, p. 209-212, 2005.

DE BRUM, Tainá L. et al. Polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules have diverse skin penetration. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 773-780, 2015.

DE LAMIRANDE, Eve; GAGNON, Claude. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**, v. 10, n. suppl_1, p. 15-21, 1995.

DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, v. 53, n. 3, p. 761-771, 2000.

DE MATOS, Daniel G. et al. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. **Molecular reproduction and development**, v. 42, n. 4, p. 432-436, 1995.

DE SOUSA, Paul A.; WATSON, Andrew J.; SCHULTZ, Richard M. Transient expression of a translation initiation factor is conservatively associated with embryonic gene activation in murine and bovine embryos. **Biology of reproduction**, v. 59, n. 4, p. 969-977, 1998.

DETONI, Cassia Britto et al. Photostability and Skin Penetration of Different E-Resveratrol-Loaded Supramolecular Structures. **Photochemistry and photobiology**, v. 88, n. 4, p. 913-921, 2012.

DIERICH, Andrée et al. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 23, p. 13612-13617, 1998.

DOCHERTY, John J. et al. Resveratrol inhibition of varicella-zoster virus replication in vitro. **Antiviral research**, v. 72, n. 3, p. 171-177, 2006.

EICHENLAUB-RITTER, Ursula et al. Mechanisms of spontaneous and chemically-induced aneuploidy in mammalian oogenesis: basis of sex-specific differences in response to aneugens and the necessity for further tests. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 372, n. 2, p. 279-294, 1996.

EL MOUATASSIM, S.; GUERIN, P.; MENEZO, Y. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, n. 8, p. 720-725, 1999.

EMERICH, D. F. Nanomedicine--prospective therapeutic and diagnostic applications. **Expert opinion on biological therapy**, v. 5, n. 1, p. 1, 2005.

EPPIG, John J. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. **Nature**, v. 281, n. 5731, p. 483-484, 1979.

EPPIG, John J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 829-838, 2001.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular reproduction and development**, v. 42, n. 4, p. 437-442, 1995.

FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836-848, 2009.

FERRY, David; GOODNICK, Stephen Marshall. **Transport in nanostructures**. Cambridge university press, 1997.

FEYNMAN, Richard P. There's plenty of room at the bottom. **Engineering and science**, v. 23, n. 5, p. 22-36, 1960.

FIEL, Luana Almeida et al. Diverse deformation properties of polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules. **Soft Matter**, v. 7, n. 16, p. 7240-7247, 2011.

FOOTE, R. H. The gametogenic function of the aging ovary in the mammal. In: **Aging Gametes: Their Biology and Pathology**. Karger Publishers, 1975. p. 179-200.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of reproduction**, v. 50, n. 2, p. 225-232, 1994.

FULDA, Simone. Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of cancer. **Drug discovery today**, v. 15, n. 17, p. 757-765, 2010.

FUKUI, Y. et al. Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. **Journal of reproduction and fertility**, v. 92, n. 1, p. 125-131, 1991

GIANAROLI, Luca et al. Best practices of ASRM and ESHRE: a journey through reproductive medicine. **Human Reproduction**, v. 27, n. 12, p. 3365-3379, 2012.

GONÇALVES, Fernanda da Silva et al. Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 1, p. 129-135, 2010.

GONDOS, B. (1970). *In* "Gonadotrophins and Ovarian Development" (W. R. Butt, A. C. Crooke, and M. Ryle, eds.). pp. 239-247. Livingstone, Edinburgh.

GUERIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human reproduction update**, v. 7, n. 2, p. 175-189, 2001.

GUTTERIDGE, John MC. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. **Chemico-biological interactions**, v. 91, n. 2-3, p. 133-140, 1994.

HALEY, Sheila A.; WESSEL, Gary M. Regulated proteolysis by cortical granule serine protease 1 at fertilization. **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 5, p. 2084-2092, 2004.

HALLIWELL, B. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. **Free radical in biology and medicine**, p. 86-123, 1989.

HANSMANN, I.; PABST, B. Nondisjunction by failures in the molecular control of oocyte maturation. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 174, n. 6, p. 485-490, 1992.

HARVEY, M. B. et al. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo coculture. **Biology of reproduction**, v. 53, n. 3, p. 532-540, 1995.

HASSOLD, Terry; HUNT, Patricia. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 4, p. 280-291, 2001.

HAYES, John D.; FLANAGAN, Jack U.; JOWSEY, Ian R. Glutathione transferases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 45, p. 51-88, 2005.

HIRSHFIELD, Anne Newman. Development of follicles in the mammalian ovary. **International review of cytology**, v. 124, p. 43-101, 1991.

HOLT, William V.; BROWN, Janine L.; COMIZZOLI, Pierre. Conclusions: environmental change, wildlife conservation and reproduction. In: **Reproductive Sciences in Animal Conservation**. Springer New York, 2014. p. 503-514.

HOSOE, M. et al. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote**, v. 5, n. 4, p. 371-376, 1997.

HOWITZ, Konrad T. et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature**, v. 425, n. 6954, p. 191-196, 2003.

HUANG, Fu-Jen; CHIN, Ting-Yu; CHAN, Wen-Hsiung. Resveratrol protects against methylglyoxal-induced apoptosis and disruption of embryonic development in mouse blastocysts. **Environmental toxicology**, v. 28, n. 8, p. 431-441, 2013.

HUYNH, Ngoc Trinh et al. Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. **International journal of pharmaceuticals**, v. 379, n. 2, p. 201-209, 2009.

HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructure of oocyte maturation and fertilization in superovulated cattle. **Progress in clinical and biological research**, v. 296, p. 287-297, 1988.

HYTTEL, Poul et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 23-32, 1997.

HYTTEL, Poul; CALLESEN, Henrik; GREVE, Torben. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. **Journal of reproduction and fertility**, v. 76, n. 2, p. 645-656, 1986.

HYUN, Sang-Hwan; KWAK, Seong-Sung. The effects of resveratrol on oocyte maturation and preimplantation embryo development. **J Embryo Transf**, v. 27, p. 71-80, 2012.

HSUEH, Aaron JW; BILLIG, Hakan; TSAFRIRI, Alex. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. **Endocrine reviews**, v. 15, n. 6, p. 707-724, 1994.

KAIPIA, Antti; HSUEH, Aaron JW. Regulation of ovarian follicle atresia. **Annual review of physiology**, v. 59, n. 1, p. 349-363, 1997.

ITAMI, N. et al. Resveratrol improves the quality of pig oocytes derived from early antral follicles through sirtuin 1 activation. **Theriogenology**, v. 83, n. 8, p. 1360-1367, 2015.

IWATA, H. et al. Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. **Theriogenology**, v. 50, n. 3, p. 365-375, 1998.

JÄGER, Eliézer et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 130-140, 2009.

JANG, Jung-Hee; SURH, Young-Joon. Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 496, n. 1, p. 181-190, 2001.

JANG, Meishiang et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 275, n. 5297, p. 218-220, 1997.

KANG, Hyun Tae; HWANG, Eun Seong. Nicotinamide enhances mitochondria quality through autophagy activation in human cells. **Aging cell**, v. 8, n. 4, p. 426-438, 2009.

KARUPPAGOUNDER, Saravanan S. et al. Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. **Neurochemistry international**, v. 54, n. 2, p. 111-118, 2009.

KHAZAEI, Mozafar; AGHAZ, Faranak. Reactive Oxygen Species Generation and Use of Antioxidants during In Vitro Maturation of Oocytes. **International Journal of Fertility & Sterility**, v. 11, n. 2, 2017.

KNOX, Robert V. Impact of swine reproductive technologies on pig and global food production. In: **Current and Future Reproductive Technologies and World Food Production**. Springer New York, 2014. p. 131-160.

KOBAYASHI, Mariko; LEE, Eun-Song; FUKUI, Yutaka. Cysteamine or β -mercaptoethanol added to a defined maturation medium improves blastocyst formation of porcine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, v. 65, n. 6, p. 1191-1199, 2006.

KOMNINO, E. R. et al. Effects of Two Types of Melatonin-Loaded Nanocapsules with Distinct Supramolecular Structures: Polymeric (NC) and Lipid-Core Nanocapsules (LNC) on Bovine Embryo Culture Model. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, 2016.

KUBELKA, M. et al. Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. **Molecular Reproduction and Development**, v. 19, n. 4, p. 423-431, 1988.

KUMAR, T. Rajendra et al. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. **Nature genetics**, v. 15, n. 2, p. 201-204, 1997.

KWAK, Seong-Sung et al. The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. **Theriogenology**, v. 78, n. 1, p. 86-101, 2012.

LANGER, Robert. Drug delivery and targeting. **Nature**, v. 392, n. 6679, p. 5-10, 1998.

LONERGAN, P.; FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos—Dealing with the warts. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 17-22, 2008.

LUCAS, C. G. et al. Tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules decrease reactive oxygen species levels and improve bovine embryonic development during in vitro oocyte maturation. **Reproductive Toxicology**, v. 58, p. 131–139, 2015.

LUCAS, Caroline G. et al. High doses of lipid-core nanocapsules do not affect bovine embryonic development in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 45, p. 194-201, 2017.

MA, Rujun et al. Sirt1 protects pig oocyte against in vitro aging. **Animal Science Journal**, v. 86, n. 9, p. 826-832, 2015.

MAHAL, H. S.; MUKHERJEE, T. Scavenging of reactive oxygen radicals by resveratrol: antioxidant effect. **Research on chemical intermediates**, v. 32, n. 1, p. 59-71, 2006.

MAILHES, John B.; YOUNG, Daniel; LONDON, Steve N. 1, 2-Propanediol-induced premature centromere separation in mouse oocytes and aneuploidy in one-cell zygotes. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 1, p. 92-98, 1997.

MAREI, Waleed F.; WATHES, D. Claire; FOULADI-NASHTA, Ali A. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. **Reproduction**, v. 139, n. 6, p. 979-988, 2010.

MARION, G. B.; GIER, H. T. Ovarian and uterine embryogenesis and morphology of the non-pregnant female mammal. **Journal of animal science**, v. 32, n. Supplement_1, p. 24-47, 1971.

MASUI, Yoshio. The elusive cytostatic factor in the animal egg. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 1, n. 3, p. 228-231, 2000.

MAYES, M. A.; SIRARD, M. A. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 911-922, 2001.

MEMILI, Erdogan; FIRST, Neal L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. **Zygote**, v. 8, n. 1, p. 87-96, 2000.

MIYAZAKI, Shunichi; ITO, Masahiko. Calcium signals for egg activation in mammals. **Journal of pharmacological sciences**, v. 100, n. 5, p. 545-552, 2006.

MTANGO, Namdori R.; POTIREDDY, Santhi; LATHAM, Keith E. Oocyte quality and maternal control of development. **International review of cell and molecular biology**, v. 268, p. 223-290, 2008.

NIGG, Erich A. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 2, n. 1, p. 21-32, 2001.

OUTEIRO, T. F.; MARQUES, O.; KAZANTSEV, A. Therapeutic role of sirtuins in neurodegenerative disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1782, n. 6, p. 363–369, 2008.

PALSAMY, P.; SUBRAMANIAN, S. Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, n. 9, p. 598-605, 2008.

PERVAIZ, Shazib; HOLME, Andrea Lisa. Resveratrol: its biologic targets and functional activity. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 11, p. 2851-2897, 2009.

PINCUS, Gregory; ENZMANN, E. Vr. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. The activation of ovarian eggs. **Journal of Experimental Medicine**, v. 62, n. 5, p. 665-675, 1935.

POHLMANN, Adriana Raffin et al. Poly (ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert opinion on drug delivery**, v. 10, n. 5, p. 623-638, 2013.

REMIÃO, M. H. et al. Melatonin delivery by nanocapsules during in vitro bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. **Reproductive Toxicology**, v. 63, p. 70–81, 2016.

RICHARD, François J.; SIRARD, Marc-André. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 1, p. 22-28, 1996.

RIUS, Cristina et al. Trans-but not cis-resveratrol impairs angiotensin-II-mediated vascular inflammation through inhibition of NF- κ B activation and peroxisome proliferator-activated receptor- γ upregulation. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 6, p. 3718-3727, 2010.

ROBERT, Claude et al. Subtractive hybridization used to identify mRNA associated with the maturation of bovine oocytes. **Molecular reproduction and development**, v. 57, n. 2, p. 167-175, 2000.

SALUSTRI, A.; YANAGISHITA, Masaki; HASCALL, Vincent C. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 23, p. 13840-13847, 1989.

SARIKAYA, Mehmet et al. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. **Nature materials**, v. 2, n. 9, p. 577-585, 2003.

SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogenèse. **Rec. Méd. Vét.**, v.157, p.29-38. 1981.

SCHULTZ, Richard M. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. **Human Reproduction Update**, v. 8, n. 4, p. 323-331, 2002.

SHI, Pu; GUSTAFSON, Joshua A.; MACKAY, J. Andrew. Genetically engineered nanocarriers for drug delivery. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 1617, 2014.

SIES, Helmut. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental physiology**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.

SIKKA, Suresh C. Andrology lab corner: Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of andrology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.

SIRARD, M. A. et al. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of reproduction**, v. 40, n. 6, p. 1257-1263, 1989.

SIRARD, M.-A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v. 49, n. 2, p. 483-497, 1998.

SIRARD, Marc-André et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126-136, 2006.

SOLEAS, George J.; DIAMANDIS, Eleftherios P.; GOLDBERG, David M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone?. **Clinical biochemistry**, v. 30, n. 2, p. 91-113, 1997.

SOVERNIGO, T. C. et al. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. **Reproduction in Domestic Animals**, 2017.

SUGIURA, Koji et al. Study of germinal vesicle requirement for the normal kinetics of maturation/M-phase-promoting factor activity during porcine oocyte maturation. **Biology of reproduction**, v. 74, n. 3, p. 593-600, 2006.

SUGINO, Norihiro. Reactive oxygen species in ovarian physiology. **Reproductive medicine and biology**, v. 4, n. 1, p. 31-44, 2005.

SUN, Qing-Yuan. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. **Microscopy research and technique**, v. 61, n. 4, p. 342-348, 2003.

SUTTON-MCDOWALL, Melanie L.; GILCHRIST, Robert B.; THOMPSON, Jeremy G. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction**, v. 139, n. 4, p. 685-695, 2010.

SZMITKO, Paul E.; VERMA, Subodh. Red wine and your heart. **Circulation**, v. 111, n. 2, p. e10-e11, 2005.

TAMURA, Hiroshi et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. **Journal of pineal research**, v. 44, n. 3, p. 280-287, 2008.

TAKEO, S. et al. Age-associated changes in gene expression and developmental competence of bovine oocytes, and a possible countermeasure against age-associated events. **Molecular reproduction and development**, v. 80, n. 7, p. 508-521, 2013.

TRELA, Brent C.; WATERHOUSE, Andrew L. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 1253-1257, 1996.

VAN WOUDEBERG, Anna Beker et al. The bovine oocyte in vitro maturation model: a potential tool for reproductive toxicology screening. **Reproductive Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 251-260, 2012.

VASTANO, Bret C. et al. Isolation and Identification of Stilbenes in Two Varieties of *Polygonum cuspidatum*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 2, p. 253-256, 2000.

VENTURINI, Cristina G. et al. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, n. 1, p. 200-208, 2011.

VIAN, M. Abert et al. Simple and rapid method for cis-and trans-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, n. 2, p. 224-229, 2005.

WANG, Feng et al. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. **Fertility and sterility**, v. 101, n. 2, p. 577-586. e1, 2014.

WANG, Feng et al. Melatonin promotes the in vitro development of pronuclear embryos and increases the efficiency of blastocyst implantation in murine. **Journal of pineal research**, v. 55, n. 3, p. 267-274, 2013.

WANG, Shu et al. Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 4, p. 363-376, 2014.

WESTPHAL, C. H.; DIPP, M. A.; GUARENTE, L. A therapeutic role for sirtuins in diseases of aging? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 12, p. 555–560, 2007.

WIKIPÉDIA, Ciclo Menstrual. Disponível em:
<https://pt.wikipedia.org/wiki/Ciclo_menstrual> Acesso em: 15 out 2017.

YOU, Jinyoung et al. Anthocyanin stimulates in vitro development of cloned pig embryos by increasing the intracellular glutathione level and inhibiting reactive oxygen species. **Theriogenology**, v. 74, n. 5, p. 777-785, 2010.