

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**ESCOLA DE VETERINÁRIA**  
**Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**EFEITO DA ADIÇÃO DO FULEROL AO MEIO DE MATURAÇÃO *IN VITRO* DE  
OÓCITOS BOVINOS**

**VÍCTOR MUTTI DRUMMOND RIBEIRO PRATA**

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária – UFMG

2019

VÍCTOR MUTTI DRUMMOND RIBEIRO PRATA

**EFEITO DA ADIÇÃO DO FULLEROL AO MEIO DE MATURAÇÃO *IN VITRO* DE  
OÓCITOS BOVINOS**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como  
requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre  
em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Álan Maia Borges

Belo Horizonte

Escola de Veterinária – UFMG

2019

Prata, Victor Mutti Drummond Ribeiro, 1992.

P912e Efeito da Adição do Fulerol ao meio de maturação *In Vitro* de Oócitos Bovinos / Victor Mutti Drummond Ribeiro Prata – 2019.

44p.: il.

Orientador: Álan Maia Borges

Dissertação de Mestrado apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Bovino – Reprodução - Teses - 2 – Oócitos – Teses - 3 – Células foliculares – Teses –

I – Borges, Álan Maia – II – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

III – Título.

**CDD – 636.08926**


Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### VÍCTOR MÚTTI DRUMMOND RIBEIRO PRATA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Reprodução Animal.

Aprovado(a) em 01 de novembro de 2019, pela banca constituída pelos membros:



Prof(a). Alan Mala Borges  
Presidente - Orientador(a)



Prof(a). Leticia Zoccolaro Oliveira



Prof(a). Mariana Machado Neves

## AGRADECIMENTOS

Chega ao fim mais uma etapa. Uma caminhada de muita dedicação, resiliência e aprendizado que, com toda certeza, eu não conseguiria concluir sozinho. O desfecho deste trabalho só foi possível devido ao apoio de diversas pessoas que merecem minha gratidão.

À Deus, por me abençoar nessa jornada e me conceder força e resiliência para seguir em frente e superar todos os obstáculos até a conclusão deste trabalho.

À Escola de Veterinária da UFMG, por possibilitar a realização deste trabalho.

À FAPEMIG e ao CNPq, pelo apoio financeiro. E à CAPES, por me conceder a bolsa de estudo.

À minha família, pelo amor, carinho e torcida de sempre. Aos meus pais, pela paciência e por me estimular nos momentos mais difíceis. À minha avó Glória, pelos conselhos e apoio. À Patrícia, por estar ao meu lado durante toda essa jornada, por amenizar os problemas e me fazer enxergar o lado bom dos momentos difíceis.

Ao Prof. Alan Maia Borges, pela confiança, conselhos e amizade, pela oportunidade de realizar este trabalho e por compartilhar tanto conhecimento.

À equipe do Laboratório de Produção *in vitro* de embriões da Escola de Veterinária da UFMG. À Ana Carolina Leite, pela disposição e paciência em transmitir seus conhecimentos. À Eliane Beatriz, pela amizade e auxílio em todas as etapas. Ao Philipe Pimenta, por ser um dos pilares desse experimento, me motivando a trabalhar com nanotecnologia. Ao Luciano Carvalheira, por estar sempre presente nas rotinas, ajudando e compartilhando o ambiente de trabalho. À Teresa, pela disposição e empenho.

À Marina de Souza Ladeira do Departamento de Farmácia da UFMG, pelo fornecimento do Fulerol e por sempre ter esclarecido minhas dúvidas quanto a diluição, armazenamento e utilização da nanopartícula.

Ao frigorífico FrigoBet, por possibilitar meu livre acesso à planta frigorífica para realizar a coleta de ovários, disponibilizando vestuário e equipamentos. À Elizabeth, pelo exemplo de mulher e de humildade, pela amizade e por não medir esforços para me ajudar. Ao “Marquinho”, Samuel, Emanuelle, pessoal da inspeção e demais funcionários do frigorífico, o meu muito obrigado.

À Profa. Maristela Palhares, por disponibilizar o banho maria ultrassônico.

À Profa. Ângela Maria Quentão Lana, pela ajuda nos cálculos estatísticos.

“É precisamente na fronteira do conhecimento que a imaginação tem seu papel mais importante; o que ontem foi apenas um sonho, amanhã poderá se tornar realidade.”

“A ciência jamais responderá a todas as perguntas pelo simples motivo de que jamais saberemos todas as perguntas que podem ser feitas.”

Marcelo Gleiser

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{L}$  – Microlitro  
 $\mu\text{L}$  - Micromolar  
 $\gamma$ -GCS –  $\gamma$ -glutamato-cisteína-ligase  
ALA – Ácido alfa-lipóico  
ALCAR – Acetil l-carnitina  
ARE – Elemento de resposta antioxidante  
BSA – Albumina sérica bovina  
Bx – Blastocisto expandido  
 $\text{C}_{60}$  – Fulereno  
 $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$  – Fulerol  
 $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$  – Cloreto de cálcio dihidratado  
CIV – Cultivo *in vitro*  
COCs – Complexo *cumulus oophorus*  
D2 – Segundo dia de cultivo embrionário  
D7 – Sétimo dia de cultivo embrionário  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
EROs – Espécies reativas de oxigênio  
FIV – Fertilização *in vitro*  
FSH – Hormônio folículo estimulante  
 $\text{H}_2\text{O}$  – Água  
 $\text{H}_2\text{O}_2$  – Peróxido de hidrogênio  
HELFs – Fibroblastos embrionários de pulmão humano  
HO-1 - Heme oxigenase-1  
IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo  
IETS – Sociedade Internacional de Transferência de Embriões  
KCl – Cloreto de potássio  
LH – Hormônio luteinizante  
MI – Metáfase I  
MII – Metáfase II  
mg – miligrama  
 $\text{Mg}(\text{Cl}_2)_6\text{H}_2\text{O}$  – Cloreto de magnésio hexahidratado  
MIV – Maturação *in vitro*  
mL - mililitro  
mm – milímetro  
mM – milimolar  
 $\text{N}_2$  – Dinitrogênio  
NaCl – Cloreto de sódio  
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – Fosfato monossódico  
 $\text{NaHCO}_3$  – Bicarbonato de sódio  
NaOH – Hidróxido de sódio  
nM - Nanomolar  
NQO-1 - Quinona oxireductase-1  
Nrf2 – Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2  
NO – Óxido nítrico

O<sub>2</sub> – Oxigênio  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Superóxido  
OH<sup>-</sup> - Radical hidroxila  
PBS – *Phosphate Buffered Saline*  
PHE – *Heparin and penicillamine-hypotaurine-epinephrine*  
PIVE – Produção *in vitro* de embriões  
QVG – Quebra de vesícula germinativa  
RNA – Ácido ribonucleico  
RPM – Rotações por minuto  
SFB – Soro fetal bovino  
SOF – *Synthetic oviduct fluid medium*  
TALP – *Tyrode/albumin/sodium lactate/sodium pyruvate*  
TBAH – Hidróxido de tetrabutilamônio  
TCM – *Tissue Culture Medium*  
TE – Transferência de Embriões  
TUNEL – *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*  
OPU – *Ovum pick up*  
VG – Vesícula Germinativa



---

## SUMÁRIO

---

|  |    |
|--|----|
| LISTA DE TABELAS.....  | 9  |
| LISTA DE FIGURAS.....  | 10 |
| LISTA DE GRÁFICOS.....   | 11 |
| RESUMO.....  | 12 |
| ABSTRACT.....  | 14 |
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 16 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....  | 17 |
| 2.1. Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....   | 17 |
| 2.2. Estresse oxidativo na produção <i>in vitro</i> de embriões.....   | 19 |
| 2.3. Ação dos antioxidantes nos meios de cultivo embrionário <i>in vitro</i> .....                                       | 20 |
| 2.4. Nanotecnologia e sua importância para as áreas médicas e biológicas.....  | 22 |
| 2.5. Fulerol – A classe dos fulerenos e sua importância nas ciências médicas.....  | 22 |
| 2.6. Mecanismos antioxidantes do Fulerol.....  | 24 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....   | 25 |
| 3.1. Síntese laboratorial do fulerol.....  | 26 |
| 3.2. Diluição do fulerol para obtenção das soluções de trabalho.....   | 26 |
| 3.3. Confeção dos meios de maturação dos oócitos.....  | 27 |
| 3.4. Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....   | 27 |
| 3.4.1. Obtenção dos complexos <i>cumulus oophorus</i> (COCs).....  | 27 |
| 3.4.2. Maturação <i>in vitro</i> dos complexos <i>cumulus oophorus</i> (COCs).....                                       | 28 |
| 3.4.3. Fecundação <i>in vitro</i> (FIV) dos oócitos bovinos.....   | 29 |
| 3.4.4. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV) dos embriões bovinos.....   | 30 |
| 3.4.5. Avaliação das taxas de clivagem e de produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....                            | 30 |
| 3.4.6. Avaliação da taxa de apoptose pelo método de TUNEL.....   | 31 |
| 3.4.7. Taxa de maturação nuclear de oócitos bovinos incubados em meios contendo diferentes concentrações de fulerol..... | 31 |
| 3.4.8. Análises Estatísticas.....  | 32 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 32 |
| 5. CONCLUSÕES.....   | 39 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....   | 39 |
| 7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....   | 40 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 41 |

---

---

## LISTA DE TABELAS

---

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Classificação dos oócitos bovinos segundo as características dos complexos <i>cumulus oophorus</i> (COCs) e citoplasma, de acordo com a metodologia de Gonçalves <i>et al.</i> (2008).....   | 27 |
| Tabela 2 - Taxas de clivagem, de produção de embriões/clivados e de produção de embriões/total de oócitos bovinos cultivados <i>in vitro</i> em meios contendo diferentes concentrações de fulerol.....   | 29 |
| Tabela 3 - Médias $\pm$ desvios-padrão do número total de blastômeros, número total de blastômeros apoptóticos e percentual de células apoptóticas em relação ao total de células de blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i> em meios contendo diferentes concentrações de fulerol..... | 31 |
| Tabela 4 - Efeito da adição do fulerol em diferentes concentrações sobre a taxa de maturação nuclear de oócitos bovinos cultivados <i>in vitro</i> .....  | 35 |

---

---

## LISTA DE FIGURAS

---

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Sequência de reações químicas que resultam na formação das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) nas células. $O_2$ = Oxigênio; $O_2^-$ = radical superóxido; $H^+$ = íon hidrogênio; $H_2O_2$ = Peróxido de hidrogênio; $OH^-$ = radical hidroxila; $OH^+$ = hidróxido; $Fe^{+3}$ = íon ferro; $e^-$ = elétron (Adaptado de Crocomo, 2012).....   | 19 |
| Figura 2 | Representação tridimensional da manomolécula Fulereo C60. É constituído por 60 átomos de carbono em forma de um polígono de 60 vértices e 32 faces, sendo 12 pentagonais e 20 hexagonais.....   | 21 |
| Figura 3 | Esquema tridimensional da nanomolécula Fulereo polihidroxilado ou Fulerol (C60(OH)24). Esferas azuis – átomos de carbono; esferas vermelhas – átomos de oxigênio; esferas brancas – átomos de hidrogênio) (Adaptado de Semenov, 2016).....  | 22 |
| Figura 4 | Esquema da distribuição de oócitos bovinos na placa de maturação <i>in vitro</i> , segundo os diferentes tratamentos com diferentes concentrações de fulerol.....   | 28 |
| Figura 5 | Blastocistos expandidos bovinos. As colunas representam imagens de um mesmo embrião produzido <i>in vitro</i> dos tratamentos 2 e 4, demonstrando o total de blastômeros corados pelo Hoechst (azul) observados em filtro de 460nm; e o total de células apoptóticas (verde) observadas em filtro de 520nm, corados pela técnica <i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling</i> . Imagens obtidas por microscopia de fluorescência em aumento de 400X..... | 34 |
| Figura 6 | Marcação nuclear de oócitos bovinos corados com Hoechst, após 24 horas de maturação <i>in vitro</i> . Oócitos em estágio de vesícula germinativa (A), quebra de vesícula germinativa (B), metáfase I (C), metáfase II (D).....  | 36 |

---

## LISTA DE GRÁFICOS

---

|  |    |
|--|----|
| Gráfico 1 Taxa de maturação de oócitos bovinos cultivados <i>in vitro</i> com meios de maturação contendo diferentes concentrações de fulerol..... | 37 |
|--|----|

## RESUMO

O estresse oxidativo é a principal causa de baixa eficiência na maturação de oócitos e no desenvolvimento embrionário *in vitro* de embriões bovinos. Isso ocorre devido a um desbalanço entre a quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) e antioxidantes. O ambiente *in vitro* possui alta tensão de oxigênio que, associada a outros fatores como a interferência da luz, presença de espermatozoide e ausência de antioxidantes maternos, leva à maior produção de EROs, se comparado ao ambiente *in vivo*. No presente experimento, foi avaliado o efeito da adição de fulerol em diferentes concentrações ao meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos (MIV) sobre as taxas de produção e qualidade dos embriões produzidos. O fulerol é reconhecido como um potente antioxidante, uma molécula muito eletronegativa, estável, e capaz de alcançar locais específicos. Foram utilizados quatro meios MIV: Grupo 1 – controle (CO) (n=461 oócitos): meio TCM 199 bicarbonato; Grupo 2 (F1) (n=461): meio TCM 199 bicarbonato acrescido de fulerol a 1nM; Grupo 3 (F10) (n=439): meio TCM 199 bicarbonato acrescido de fulerol a 10nM; Grupo 4 (F50) (n=451): meio TCM 199 bicarbonato acrescido de fulerol a 50nM. Os oócitos foram maturados em incubadora por 24 horas a 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Posteriormente, foram fertilizados e cultivados em mesmo meio de fertilização e cultivo, respectivamente. No segundo dia de cultivo (D2), foi avaliada a taxa de clivagem e no sétimo dia de cultivo (D7) foram avaliadas a taxa de produção de blast<sup>oc</sup>istos sobre os embriões clivados e a taxa de produção de blastocistos sobre o total de oócitos maturados. Além disso, após observação e definição dessas taxas, os embriões produzidos foram fixados para avaliação de apoptose celular pelo método de TUNEL. Os oócitos foram avaliados quanto à maturação nuclear pelo método de Hoechst. Não houve diferença estatística (P>0,05) nas taxas de clivagem (73,96%; 73,53%; 73,12%; 76,94%) para T1; F1; F10 e F50, respectivamente. A produção de blastocistos diferiu (P<0,05) entre os tratamentos. CO, F1 e F50 demonstraram resultados estatisticamente semelhantes (P>0,05) (CO=30,15%; F1=27,11%; F50=31,04%). CO e F50 obtiveram resultados superiores (P<0,05) a F10 (23,91%), que não diferiu (P>0,05) do F1. O número total de células por embrião (CO=130,84; F1=129,78; F10=110,72; F50=134,05) e o número total de células apoptóticas (CO=8,52; F1=7,68; F10=7,54; F50=5,85) não diferiram (P>0,05) entre os tratamentos. A taxa de apoptose foi superior (P<0,05) no CO (7,43%) em relação a F50 (4,23%). CO, F1 (5,94%) e F10 (6,98%) não diferiram (P>0,05), assim como F1, F10 e F50 foram estatisticamente iguais (P>0,05). Não houve diferença (P>0,05) entre a taxa de oócitos maturados (Metáfase II) entre os tratamentos (CO=53,3%; F1=48,2%;

F10=48,0%; F50=33,3%). Conclui-se que a presença de fulerol no meio MIV não interferiu nas taxas maturação dos oócitos e de clivagem, porém reduziu a produção de blastocistos em meio na concentração de 10nM de fulerol. Na concentração de 50nM de fulerol os resultados de clivagem e produção de blastocistos foram iguais às do grupo controle, porém reduziu a taxa de apoptose, quando comparado com o esse mesmo grupo.

**Palavras-chave:** antioxidante, maturação oocitária, nanopartículas de carbono, fulerol, produção *in vitro* de embriões bovinos.

## ABSTRACT

Oxidative stress is the main cause of low efficiency in oocyte maturation and embryo development in *in vitro* embryo production, due to an imbalance between the amount of reactive oxygen species (ROS) and antioxidants. The *in vitro* atmosphere has a high oxygen tension, which associated with other factors such as light interference, presence of sperm and absence of maternal antioxidants lead to a higher production of ROS, when compared to the *in vivo* atmosphere. The present study was aimed to evaluate the effect of the addition of fulleranol, in distinct concentrations to the *in vitro* maturation media of bovine oocytes (IVM), on the production rates and quality of the embryos produced. Fulleranol is recognized as a powerful antioxidant, a very electronegative and stable molecule that is able to reach to specific targets. Four distinct IVM media were tested: group 1 – control (CO) (n=461 oocytes): TCM 199 bicarbonate media; group 2 (F1) (n=461): TCM 199 bicarbonate media with 1nM of fulleranol; group 3 (F10) (n=439): TCM 199 bicarbonate media with 10nM of fulleranol; group 4 (F50) (n=451): TCM 199 bicarbonate media with 50nM of fulleranol. Oocytes were matured in incubator during 24 hours at 38°C, 5% of CO<sub>2</sub> and humidity of 95%. Subsequently, the oocytes were fertilized and cultivated in the same media of fertilization and cultivation, respectively. On the second day of culture (D2) the cleavage rate was evaluated, and on the seventh day (D7) the blastocyst rate by the total of cleavage embryos and the rate of blastocyst production by the total number of matured oocytes were evaluated. In addition, after observation and definition of those rates, embryos produced were fixed for posterior TUNEL assay. Nuclear maturation was evaluated by meiotic status at the end of oocyte maturation using HOECHST staining. There were no statistical difference (P>0.05) between cleavage rates (73.96%; 73.53%; 73.12%; 76.94%) for CO, F1, F10 and F50, respectively. Blastocyst rate differed between treatments. CO, F1 and F50 showed statistically similar (P>0.05) results (CO=30.15%, F1=27.11%, F50=31.04%). CO and F50 had higher (P<0.05%) blastocyst production than F10 (23.91%), which was equal to F1. The total number of cells per embryo (CO=130.84, F1=129.78, F10=110.72, F50=134.05) and the total number of apoptotic cells (CO=8.52, F1=7.68, F10=7.54, F50=5.85) did not differ (P>0.05) between treatments. The apoptosis rate was higher (P<0.05) in CO (7.43%) than F50 (4.23%). CO, F1 (5.94%) and F10 (6.98%) did not differ (P>0.05), as F1, F10 and F50 were statistically similar (P>0.05). Nuclear maturation (metaphase II) did not differ (P>0.05) between treatments (CO=53.3%; F1=48.2%; F10=48.0%; F50=33.3%). In conclusion, the presence of fulleranol in the IVM media had no effect

on nuclear maturation rate and the cleavage rate, while reduced the blastocyst production at 10nM concentration. In high concentration of fullereneol (50nM), cleavage and blastocyst production were similar ( $P>0.05$ ) to the control group, however reduced apoptosis rate when compared to the same treatment.

**Keywords:** antioxidant, carbon nanoparticles, fullereneol, *in vitro* bovine embryo production, oocyte maturation.



## Introdução

O crescimento demográfico mundial exigirá maior produção de alimentos e, logo, este competitivo mercado necessitará de se expandir tanto no comércio nacional quanto internacional, buscando alternativas para o seu crescimento quantitativo e qualitativo. Dessa forma, o melhoramento genético e as biotecnologias reprodutivas se tornam de grande importância para o progresso da agropecuária (Costa *et al.*, 2009). Dentre as diversas biotecnias, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) se consolidou como importante ferramenta para o melhoramento genético bovino, possibilitando rápida multiplicação e disseminação de genótipos diferenciados e desejáveis (Varago, 2005; Viana, 2009).

Dados do *Data Retrieval Committee*, da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), registraram que 448.113 embriões oriundos de PIVE foram transferidos no mundo no ano de 2017. Deste total, 275.918 (61,57%) foram produzidos e transferidos no Brasil. O tamanho e as características dos rebanhos existentes no país, dando destaque às raças zebuínas que apresentam maior recuperação de oócitos por coleta, vêm contribuindo para a notoriedade brasileira no mercado de produção *in vitro* de embriões bovinos (Mello *et al.*, 2016).

Mesmo diante dos recentes avanços biotecnológicos, a eficiência da PIVE em diferentes espécies animais ainda é considerada baixa, quando comparada com os resultados obtidos *in vivo*. Dentre os fatores relacionados com a menor produção embrionária *in vitro*, a qualidade dos oócitos e as condições dos sistemas de maturação oocitária e de cultivo embrionário *in vitro* são determinantes (Kitagawa *et al.*, 2004).

O estresse oxidativo é a principal causa da baixa eficiência na maturação de oócitos e no desenvolvimento embrionário *in vitro* de diversas espécies. Esse processo é causado pelo desbalanço entre a quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) e antioxidantes, que acontece devido a diversos fatores que induzem a diminuição dos antioxidantes e/ou o aumento na produção de EROs (Luberda *et al.*, 2005).

Uma grande variedade de antioxidantes tem sido utilizada visando reduzir a produção de EROs, durante a produção *in vitro* de embriões. Entretanto, ainda não se tem conhecimento de quais antioxidantes e quais as concentrações destes são mais eficientes para permitir e impulsionar o desenvolvimento embrionário, melhorando a qualidade dos embriões produzidos. Neste sentido, a nanotecnologia tem sido utilizada em diferentes segmentos tecnológicos e científicos, como os da biologia, física, química e engenharia. Dentre os materiais nanoestruturados, o fullerol tem ganhado destaque por suas propriedades antioxidantes devido a sua alta eletronegatividade, fazendo com que esta molécula tenha alta reatividade com EROs (Tsai *et al.*, 1996; Ladeira *et al.*, 2013).

Desta forma, objetivou-se avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de fullerol ao meio de maturação *in vitro* de oócitos, sobre a quantidade e qualidade dos embriões produzidos.

## **Revisão de Literatura**

### ***Produção in vitro de embriões bovinos***

A utilização de biotécnicas reprodutivas, visando o melhoramento genético, tem aumentado significativamente a produtividade dos rebanhos bovinos nas últimas décadas. Dentre as técnicas mais utilizadas, podemos mencionar a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) (Choudhary *et al.*, 2016).

A PIVE tem ganhado destaque dentre as demais biotecnias da reprodução. Associada à coleta de oócitos a partir da punção folicular guiada por ultrassom (*Ovum Pick Up* – OPU), a PIVE tem sido utilizada como instrumento importante para maximizar exploração do potencial reprodutivo dos rebanhos bovinos. Segundo Varago e colaboradores (2008), a técnica viabiliza a utilização de animais bastante jovens, diminuindo o intervalo de gerações e permitindo selecionar potenciais matrizes para o rebanho, levando à produção de animais geneticamente superiores, o que contribui para a otimização do melhoramento genético.

No Brasil, a PIVE vem sendo a principal biotecnologia utilizada devido a sua capacidade de uso frequente, à não necessidade de pré-estimulação hormonal, a possibilidade de utilização em animais pré-púberes, em idade avançada, em início de gestação e, também, sendo a ferramenta de escolha para animais com problemas reprodutivos adquiridos e/ou que não respondem à superovulação convencional (Hansen *et al.*, 2006). Em posição de destaque no cenário mundial, o Brasil corresponde, segundo a IETS (2017), a aproximadamente 60% da produção mundial de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Com boas perspectivas, o cenário tende a melhorar em decorrência, principalmente, da pecuária de corte e, em especial, pela produção de matrizes de raças zebuínas (Varago *et al.*, 2008).

Apesar dos progressos significativos que ocorreram nas técnicas de maturação, fecundação e cultivo embrionário *in vitro*, a porcentagem de embriões que se desenvolvem naturalmente e que possuem boa qualidade é inferior, se comparado à produção *in vivo*. Na última década, numerosas evidências têm sido demonstradas, indicando que o potencial de desenvolvimento de embriões *in vitro* é influenciado pela qualidade dos oócitos e pelo ambiente ao qual eles são submetidos durante as etapas de produção. A composição dos meios, o número de estruturas por gota de maturação ou cultivo e a atmosfera gasosa são alguns dos fatores determinantes para o resultado da PIVE (Correa *et al.*, 2007).

Dentre esses fatores, o estresse oxidativo, induzido pela alta tensão de oxigênio presente no ambiente *in vitro*, tem ganhado atenção especial nos últimos anos. Estudos têm revelado que a concentração de oxigênio no lúmen do trato reprodutivo da fêmea bovina é de aproximadamente um terço (3-9%) da concentração média presente em condições *in vitro*. O cultivo embrionário em ambiente com alta tensão de oxigênio (20%) produz maior quantidade de EROs, quando comparado ao cultivo a 5% de O<sub>2</sub> ou 7% de O<sub>2</sub> (Ali *et al.*, 2003).

Como consequência da elevada concentração de EROs, reações em cadeia são desencadeadas promovendo danos celulares irreversíveis, tais como lesões de membrana que interferem na permeabilidade celular, disfunções mitocondriais e lesões ao DNA e RNA que resultam em bloqueio do desenvolvimento e comprometimento da viabilidade oocitária e embrionária (Mello Filho *et al.*, 1983; Ali *et al.*, 2003; Crocomo *et al.*, 2012).

### ***Estresse oxidativo na produção in vitro de embriões***

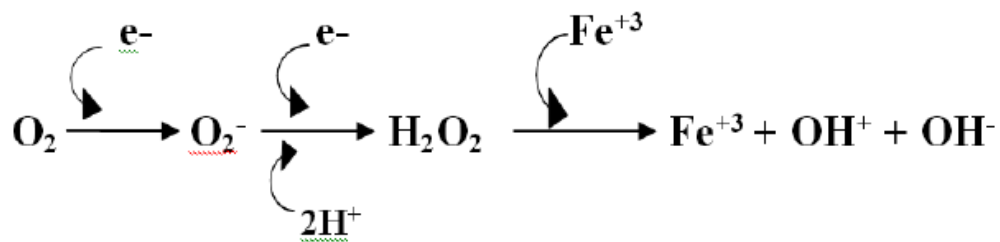
O estresse oxidativo é caracterizado por desbalanço entre os agentes antioxidantes e as EROs, com predominância de substâncias oxidantes. A produção de EROs ocorre fisiologicamente durante o metabolismo aeróbico, mesmo em condições basais e, *in vitro*, é favorecida pela alta tensão de  $O_2$  que é potencializada pela interferência da luz, a presença de espermatozoides e à ausência de proteção antioxidante materna (Guérin *et al.*, 2001).

Quando em equilíbrio, as EROs exercem efeitos benéficos atuando como moléculas sinalizadoras em processos fisiológicos, tais como regeneração tecidual, regulação redox intracelular, esteroidogênese, sinalização hormonal e embriogênese. Entretanto, em situações em que ocorre desbalanço dessas substâncias, como na PIVE, ocorrem efeitos prejudiciais às células, resultando em alteração e morte celular (Crocomo *et al.*, 2012).

A formação de EROs ocorre, principalmente, durante a respiração celular. A molécula de  $O_2$ , para ser totalmente reduzida a duas moléculas de água ( $H_2O$ ), deve receber quatro elétrons. Caso o  $O_2$  seja parcialmente reduzido pela recepção de apenas um elétron, o produto desta redução será o radical superóxido ( $O_2^-$ ). Ao receber mais um elétron e dois íons de hidrogênio, formará o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Figura 1). O  $H_2O_2$  conjugado com o ânion  $O_2^-$  formará o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ), metabólito mais reativo que pode causar sérios danos celulares (Guérin *et al.*, 2001; Crocomo *et al.*, 2012).

A formação do  $OH^\cdot$  ocorre via reação de Haber-Weiss nas mitocôndrias, onde um íon de ferro ou de cobre irá reagir com o  $H_2O_2$ , formando um radical hidroxila (Figura 1) e um íon hidróxido. Posteriormente, em outra reação,  $H_2O_2$  e  $O_2^-$  são convertidos em oxigênio, íon hidróxido e outro radical hidroxila (Liang *et al.*, 2013).

Para se tornarem estáveis, as EROs precisam adquirir elétrons. Para isso, reagem com moléculas que estiverem ao seu redor, tais como lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos, provocando a oxidação dessas moléculas. Em cultivo de embriões, como consequência, temos reações em cadeia que podem resultar em peroxidação lipídica, danos ao DNA e morte celular por apoptose ou necrose (Agarwal *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Sequência de reações químicas que resultam na formação das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) nas células.  $\text{O}_2$  = Oxigênio;  $\text{O}_2^-$  = radical superóxido;  $\text{H}^+$  = íon hidrogênio;  $\text{H}_2\text{O}_2$  = Peróxido de hidrogênio;  $\text{OH}^-$  = radical hidroxila;  $\text{OH}^+$  = hidróxido;  $\text{Fe}^{+3}$  = íon ferro;  $e^-$  = elétron (Adaptado de Crocomo, 2012).

### *Ação dos antioxidantes nos meios de cultivo embrionário in vitro*

Para proteger os oócitos e embriões do estresse oxidativo durante a PIVE, vários antioxidantes podem ser adicionados aos meios de cultura. Segundo Halliwell e Gutteridge (1989), antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas àquela do substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a oxidação daquele substrato. Em condições normais, os antioxidantes convertem EROs em água prevenindo a superprodução destes compostos, evitando o comprometimento à viabilidade celular.

De acordo com estudo de Liang (2017), o uso de citrato de sódio, acetil L-carnitina (ALCAR) e ácido alfa-lipóico (ALA) tem potencial antioxidante, reduzindo lesões mitocondriais e de DNA durante o processo de maturação oocitária *in vitro*. Além disso, Wang (2007) observou maior proporção de oócitos que se desenvolveram até o estágio de blastocisto quando adicionadas baixas concentrações de polifenóis de chá-verde ao meio de maturação.

O organismo dispõe de dois sistemas antioxidantes como forma de proteção contra os efeitos danosos do excesso de EROs: o enzimático e o não enzimático. O sistema antioxidante enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxirredoxinas e o sistema glutatona redutase peroxidase sendo que, este último, é o mecanismo de defesa primário para remoção dos EROs (Crocomo *et al.*, 2012). Dentre os compostos não enzimáticos, destacam-se os compostos de baixo peso molecular como a vitamina E ou  $\alpha$ -tocoferol, o selênio e o zinco, além da vitamina C (ácido ascórbico) que é considerada como o mais importante e potente antioxidante nutricional hidrossolúvel (Ladeira, 2013).

Além dos antioxidantes biológicos, antioxidantes sintéticos têm sido utilizados. Suas aplicações são semelhantes às dos antioxidantes biológicos, mas, além disso, eles têm grande potencial de uso na química, na indústria alimentícia, nas Medicinas Humana e Veterinária (Helmut, 1993).

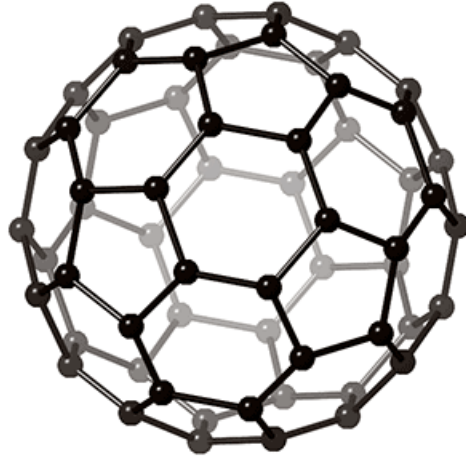
### ***Nanotecnologia e sua importância para as áreas médicas e biológicas***

A nanotecnologia, ciência que utiliza materiais na escala nanométrica, tem sido utilizada em diferentes segmentos tecnológicos e científicos, tais como na biologia, física, química e engenharia. Dentre os materiais nanoestruturados, as nanoestruturas de carbono têm ganhado notoriedade devido a sua atuação na nanomedicina, destacando-se os nanotubos de carbono e os derivados de fulerenos os exemplos mais utilizados nas últimas décadas (Ladeira *et al.*, 2013).

As nanoestruturas de carbono têm sido aplicadas em diversos campos da biologia. Pode-se destacar sua utilização como agentes carreadores de moléculas de DNA e RNA (Ladeira *et al.*, 2010); como substrato para o crescimento celular e com propriedades ósseo-indutoras (Mendes *et al.*, 2010); atividade antiviral (Zhu *et al.*, 2003); antimicrobiana (Mashino *et al.*, 1999); e por sua característica antioxidante (Takada *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2009; Ladeira *et al.*, 2013). Por isso, moléculas com potencial antioxidante tem campo de atuação promissor, uma vez que são inúmeras as doenças degenerativas causadas pela produção exacerbada de EROs e que, em grande parte delas, o tratamento com as moléculas antioxidantes disponíveis não tem gerado bons resultados (Ladeira *et al.*, 2013).

### ***Fulerol – A classe dos fulerenos e sua importância nas ciências médicas***

Os fulerenos são uma classe de nanomoléculas compostas unicamente por um número par de átomos de carbono que formam um anel tridimensional em forma de gaiola (Djordjevic, 2015) e, dentre eles, o representante mais conhecido é o C<sub>60</sub> (Figura 2) (Ladeira *et al.*, 2013).



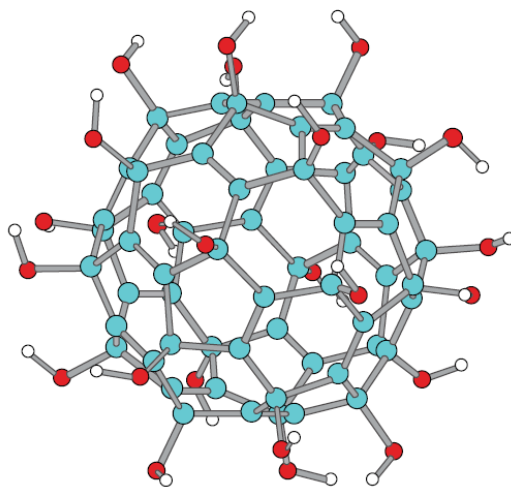
**Figura 2.** Representação tridimensional da manomolécula Fulereno  $C_{60}$ . É constituído por 60 átomos de carbono em forma de um polígono de 60 vértices e 32 faces, sendo 12 pentagonais e 20 hexagonais.

O fulereno  $C_{60}$  foi descoberto em 1985 por Kroto e colaboradores utilizando uma técnica baseada na emissão de diferentes feixes de irradiação a laser sobre a superfície de um disco de grafite em rotação, resultando na formação de um vapor constituído por átomos de carbono. Ao entrar em contato com um fluxo de gás hélio, que é liberado dentro do equipamento, os átomos de carbono resfriam, se aglomeram, e formam grupos constituídos por 60 átomos em sua maioria, sendo observados em espectrometria de massa.

Ao tentarem descobrir o fulereno  $C_{60}$ , Kroto *et al.* (1985) estavam interessados em investigar as grandes cadeias de moléculas de carbono lineares presentes no espaço interestelar, que eles já haviam observado por espectroscopia astronômica. Em 1996, Kroto veio a receber o prêmio Nobel de Química e, desde então, diversos estudos têm sido realizados utilizando o fulerol.

Os fulerenos ocorrem em quantidades pequenas na natureza, mas várias técnicas para sua produção em volumes maiores têm sido sugeridas (Djordjevic *et al.*, 2006). A molécula de  $C_{60}$  e seus análogos demonstram alta reatividade com EROs, devido sua alta eletronegatividade (Tsai *et al.*, 1996). Dessa forma, os fulerenos e os compostos desta família de moléculas possuem alta estabilidade química e grande poder antioxidante, pela capacidade de complexar e capturar as EROs, inativando e inibindo seus efeitos nocivos (Jensen *et al.*, 1996).

A molécula de fulereno apresenta características ópticas e eletrônicas únicas, porém, antes de ser utilizada ela deve ser funcionalizada devido ao seu caráter hidrofóbico. A solubilização do fulereno depende do número de grupos hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) introduzidos na molécula. A polihidroxilação, por meio de ligações de  $\text{OH}^-$  na superfície do fulereno, é uma técnica de funcionalização química da molécula capaz de gerar moléculas hidrossolúveis, sem alterar as propriedades ópticas e eletrônicas do fulereno puro (Figura 3) (Ladeira *et al.*, 2013; Djordjevic *et al.*, 2015).



**Figura 3.** Esquema tridimensional da nanomolécula Fulereno polihidroxilado ou Fulerol ( $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ ). Esferas azuis – átomos de carbono; esferas vermelhas – átomos de oxigênio; esferas brancas – átomos de hidrogênio) (Adaptado de Semenov, 2016).

### ***Mecanismos antioxidantes do Fulerol***

Denominado por Xiao e colaboradores (2006) como “esponja de radicais”, devido a sua alta capacidade antioxidante, o fulerol  $\text{C}_{60}(\text{OH})_{22}$  revelou evidências de sua aptidão em eliminar quase todos as EROs, incluindo o radical  $\text{OH}^-$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e, até mesmo, o óxido nítrico (NO) (Yin *et al.*, 2009). Embora os mecanismos antioxidantes do fulerol não sejam totalmente esclarecidos, já se tem conhecimento de como ele atua reagindo com algumas das EROs.



O fulerol possui dois tipos de mecanismo antioxidante contra o radical  $\text{OH}^\cdot$ , o mecanismo de doação e o de adição. No primeiro, o radical  $\text{OH}^\cdot$  captura um hidrogênio do grupo hidroxila da superfície do fulerol e se estabiliza. A eliminação do H da superfície da molécula de fulerol resulta em um rearranjo estrutural dela, ocorrendo liberação de energia, o que é favorável à molécula. Já no segundo mecanismo, o radical  $\text{OH}^\cdot$  é que se liga ao carbono da superfície da molécula de fulerol (Kato *et al.*, 2009). O que determina qual tipo de reação irá ocorrer é o número de hidroxilas presentes na superfície do fulerol. Fulerois pouco hidroxilados sofrem reação de adição, enquanto os fulerois altamente hidroxilados tendem a realizar reação de doação (Ueno *et al.*, 2014).

Outro mecanismo antioxidante conhecido do fulerol é o de catalisar a reação de dois radicais superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ) e duas moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  formando  $2\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2$  e  $2\text{OH}^\cdot$ , mimetizando a ação da enzima superóxido dismutase (SOD). Tal reação só ocorre na presença de fulerois com baixo e médio grau de hidroxilação, uma vez que essa classe de moléculas, com maior número de carbonos livres em sua superfície, tem maior probabilidade de receber radicais livres e iniciar a reação (Djordjevic *et al.*, 2006).

Vários são os estudos que vêm utilizando o fulerol em aplicações biológicas. Dentre eles, Dungan e colaboradores (1996) estudaram o efeito do fulerol na redução das concentrações de EROs em neurônios corticais, podendo ser uma droga potencial contra doenças degenerativas, tal como o Mal de Parkinson e Alzheimer (Dungan *et al.*, 1996). Lai *et al.* (2000) demonstraram o potencial antioxidante do fulerol contra o estresse oxidativo gerado durante processos de isquemia e reperfusão sanguínea em cães (Lai *et al.*, 2000). Em 2013, Ladeira e colaboradores avaliaram o efeito do fulerol nas disfunções cardiovasculares induzidas pelo estresse oxidativo e observaram redução da concentração de superóxido nos cardiomiócitos, evidenciando a capacidade antioxidante desta nanoestrutura.

Uma vez que o estresse oxidativo é uma das maiores causas de insucesso da PIVE, agentes antioxidantes têm sido utilizados em meios de cultivo embrionários buscando-se reduzir as concentrações de EROs. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos do derivado hidrossolúvel do fulereno, o fulerol, adicionado ao meio de maturação oocitária na PIVE, sobre a taxa de produção embrionária *in vitro* de bovinos.

## Material e Métodos

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Produção *in vitro* de embriões do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG, em Belo Horizonte/MG, durante o período junho de 2018 a junho de 2019. Todos os procedimentos adotados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo nº 308/2018).

Todos os reagentes utilizados nesse experimento foram adquiridos da empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), a menos que especificado na metodologia.

Oócitos foram obtidos de ovários provenientes de fêmeas bovinas abatidas em frigorífico abatedouro (Frigobet®), localizado no município de Betim/MG. Todos os oócitos foram fecundados com sêmen de um único touro da raça Holandesa, previamente avaliado quanto à fertilidade em sistemas de produção *in vitro*, sendo utilizada a mesma partida de sêmen durante todo o experimento.

Após obtenção, classificação e seleção, os complexos *cumulus oophorus* (COCs) foram distribuídos em delineamento totalmente casualizado em quatro grupos experimentais, com diferentes concentrações de fulerol. Posteriormente, os oócitos foram fecundados e cultivados em meio de mesma composição. No segundo (D2) e sétimo (D7) dias de cultivo foram avaliadas as taxas de clivagem e de produção de blastocistos, respectivamente. Todos os blastocistos produzidos foram fixados em paraformaldeído e armazenados em geladeira à 4°C, para posterior avaliação da taxa de apoptose. Além disso, oócitos de três repetições foram fixados pós-maturação para avaliação quanto à maturação nuclear.

### *Síntese laboratorial do fulerol*

O fulerol (C<sub>60</sub>OH<sub>22-24</sub>) foi sintetizado a partir da funcionalização química do fulereno (C<sub>60</sub>) pelo processo de polihidroxilação, realizado no Laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais.

Primeiramente, o fulereno foi solubilizado em solução de tolueno (108mg/120mL). Em seguida, uma solução de NaOH (200mM) aquecida à 50°C + TBAH (Hidróxido de Tetrabutilamonio) foi acrescentada lentamente, ficando sob agitação magnética por três horas. Ao final desse processo, obteve-se uma solução bifásica com sobrenadante cristalino contendo tolueno e um precipitado amarronzado. O sobrenadante foi removido e o precipitado colocado em um retroevaporador para evaporação de resíduos de solvente presentes nele. Por fim, foram adicionados 50mL de água destilada ao recipiente contendo os fulerenos funcionalizados, e a solução foi filtrada com filtro de Buckner, para remoção dos fulerenos C<sub>60</sub> que ficaram retidos. Para redução do pH que atinge o valor de 14, devido a solução de NaOH, foram adicionados 500mL de metanol, com posterior filtragem até obter solução de fulerenos com pH 7. Ao final da síntese, a solução foi acondicionada em estufa a 60°C, por 6 horas, gerando um pó escuro composto por fulerois de alta pureza.

#### ***Diluição do fulerol para obtenção das soluções de trabalho***

Para se obter as concentrações propostas no presente experimento (1nM, 10nM e 50nM), o fulerol de alta pureza, obtido no Laboratório de Nanomateriais da UFMG, foi submetido a diluições seriadas em solução *Phosphate buffered saline* (PBS) (D1408 Sigma).

Inicialmente, 1,8mg de um pó constituído de fulerois foi diluído em 1mL de PBS para confecção da “*solução mãe*”, fonte de todas as demais diluições, na concentração de 1800µg/mL. Logo após, 111µL da “*solução mãe*” foram retirados e adicionados a 199,889mL de PBS para obtenção da solução estoque, na concentração de 1000µg/L. Buscando-se evitar excessiva manipulação, a solução estoque foi dividida em alíquotas de 150µL e acondicionada em microtubos armazenados em geladeira a 4°C.

### ***Confecção do meio de maturação dos oócitos***

As concentrações de fulerol utilizadas foram baseadas no trabalho de Ladeira *et al.* (2013), em que demonstraram atividade antioxidante significativa do fulerol em concentrações nanomolares (1, 10 e 50nM), resultando em menores concentrações de peróxido de hidrogênio e superóxido, quantificados por quimioluminescência.

Para a confecção do meio de maior concentração de fulerol (Tratamento 4 - 50nM), 100µL da solução estoque foram misturados a 1,9mL do meio de maturação *in vitro* (MIV padrão) utilizado no tratamento 1 (Grupo Controle). Em seguida realizou-se a diluição de 400µL do meio do tratamento 4 em 1,6mL de meio de MIV para confecção do meio para o tratamento 3. Por último, 200µL do meio do tratamento 3 foram diluídos em 1,8mL de meio de MIV, atingindo a concentração mais baixa do presente estudo (1nM - tratamento 2). Assim, constituíram-se os quatro meios de maturação do presente estudo:

- Tratamento 1: Controle
- Tratamento 2: 1nM de fulerol
- Tratamento 3: 10nM de fulerol
- Tratamento 4: 50nM de fulerol

### ***Produção in vitro de embriões bovinos***

#### ***Obtenção de complexos cumulus oophorus (COCs)***

Os ovários de vacas predominantemente mestiças *Bos taurus taurus x Bos taurus indicus* foram coletados em abatedouro local (Frigobet<sup>®</sup>; Betim/MG), imediatamente após a evisceração dos animais. Essas estruturas foram armazenadas em solução fisiológica (0,9% NaCl) aquecida a 36°C e levadas ao laboratório em menos de três horas após o início da coleta dos ovários.

No laboratório, os ovários foram lavados em solução fisiológica (0,9% NaCl) aquecida a 36°C, e folículos de aproximadamente 3 a 8 mm de diâmetro foram aspirados utilizando-se agulhas (40 x 1,2 mm) acopladas a seringas de 5mL. Todo o fluido folicular aspirado foi depositado em tubos tipo Falcon de 50mL (TPP<sup>®</sup>, Suíça) e mantidos em banho-maria à temperatura de 36°C, onde permaneciam por aproximadamente 10 minutos para sedimentação.

O conteúdo sedimentado foi acrescido de meio TCM-Hepes (Gibco<sup>®</sup>, USA) para facilitar o rastreamento e a classificação dos oócitos em relação à qualidade do citoplasma e o número de camadas de células do *cumulus oophorus*, com auxílio de microscópio estereoscópico, segundo metodologia proposta por Gonçalves *et al.* (2008) apresentada na tabela 1.

Tabela 1: Classificação dos oócitos bovinos segundo as características dos complexos *cumulus oophorus* (COCs) e citoplasma, de acordo com a metodologia de Gonçalves *et al.* (2008).

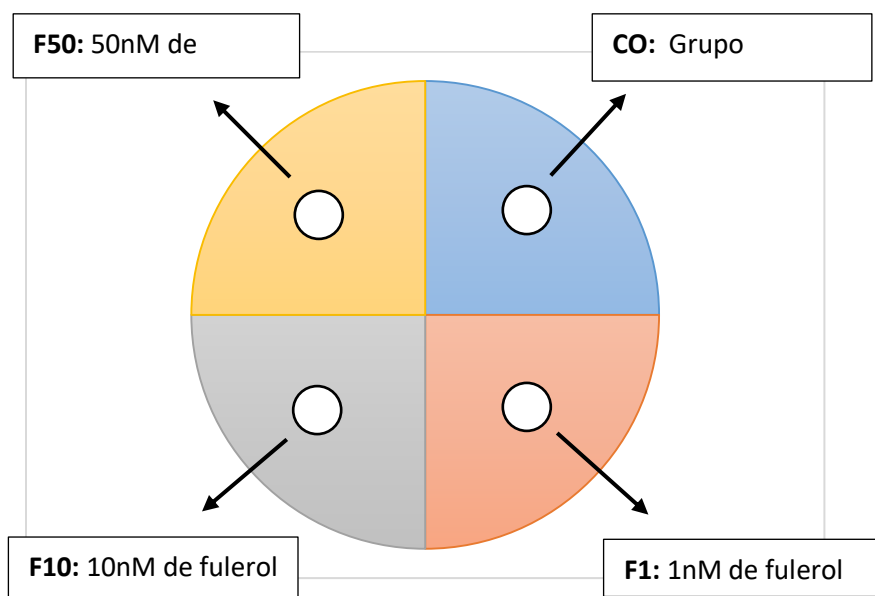
|   |
|---|
| Grau 1: COCs compactos, contendo mais de três camadas de células e citoplasma homogêneo.  |
| Grau 2: COCs compactos, contendo número de camadas de células igual ou menor a três, e citoplasma com granulações distribuídas de modo heterogêneo. |
| Grau 3: <i>Cumulus oophorus</i> presente, porém expandido. Citoplasma contraído, degenerado ou fragmentado.   |
| Grau 4: Oócitos desnudos, sem células do <i>cumulus oophorus</i> ao seu redor.  |

#### ***Maturação in vitro dos complexos cumulus oophorus (COCs)***

Após o rastreamento e classificação, oócitos (grau 1) foram divididos ao acaso em quatro grupos experimentais. Foram lavados em 2 gotas de 70µL de TCM 199 Hepes (Gibco<sup>®</sup>, USA) acrescido de soro fetal bovino (100µL/mL), amicacina (5µL/mL) e piruvato (2µL/mL). Posteriormente, os oócitos de cada grupo foram lavados em duas gotas de 70µL contendo meio de maturação TCM-199 Bicarbonato (Gibco<sup>®</sup>, USA) acrescido de soro fetal bovino (100µL/mL), amicacina (5µL/mL), piruvato (2µL/mL), LH (10µL/mL), FSH (1µL/mL), estradiol (1µL/mL) e três concentrações diferentes de fulerol de acordo com cada tratamento, da seguinte forma:

- Tratamento 1 (CO): TCM 199 Bicarbonato;
- Tratamento 2 (F1): TCM 199 Bicarbonato + 1nM fulerol;
- Tratamento 3 (F10): TCM 199 Bicarbonato + 10nM fulerol;
- Tratamento 4 (F50): TCM 199 Bicarbonato + 50nM fulerol.

A maturação *in vitro* (MIV) dos COCs foi realizada utilizando-se os mesmos meios citados anteriormente, em seus respectivos tratamentos. Aproximadamente 25 oócitos por gota foram maturados por 24 horas em gotas de 70 $\mu$ L de meio de maturação, sob óleo mineral, em placas de petri de 60x16mm (TPP®, Suíça), em estufa incubadora (Thermo Scientific) a 38,5°C, com 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e 95% de umidade, seguindo o esquema da Figura 4.



**Figura 4.** Esquema da distribuição de oócitos bovinos na placa de maturação *in vitro*, segundo os diferentes tratamentos com diferentes concentrações de fulerol.

#### ***Fecundação in vitro (FIV) dos oócitos bovinos***

Após 24 horas de maturação *in vitro*, os COCs foram retirados das gotas contendo o meio de MIV com diferentes concentrações de fulerol e lavados em meio de FIV suplementado com BSA (6mg/mL), amicacina (5 $\mu$ L/mL), piruvato (2 $\mu$ L/mL), heparina (11 $\mu$ L/mL) e PHE (44 $\mu$ L/mL). Simultaneamente, a palheta de sêmen foi descongelada por 30 segundos a 37°C para posterior seleção espermática pelo método gradiente descontínuo de Percoll, constituído por duas colunas: 350 $\mu$ L de Percoll 90% e 350 $\mu$ L de Percoll 45%. O sêmen descongelado foi depositado lentamente na superfície da camada de 45% Percoll.

Posteriormente, o microtubo cônico contendo o sêmen e a solução de percoll foi centrifugado em microcentrífuga durante seis minutos a 2020rpm. Em seguida, 200µL do *pellet* formado no fundo do tubo foi pipetado e despejado em outro microtubo contendo 500µL de meio de capacitação TALP-sêmen (*Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate*) (Solução q.s.p. 100mL – NaCl 0,582g, KCl 0,0230g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0035g, MgCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 0,0080g, NaHCO<sub>3</sub> 0,210g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,030g, Lactato de Sódio 310,4µL, Hepes 0,2380g, água Milli-Q para completar os 100mL). O microtubo foi submetido à centrifugação por dois minutos a 1610rpm.

Após a centrifugação, 100µL do *pellet* foram pipetados e ressuspensos em 40µL de meio de FIV. Desse meio contendo o sêmen e o meio de FIV, foram adicionados 7µL a cada gota da placa de FIV para inseminação, perfazendo um total de 2 x 10<sup>6</sup> espermatozoides por gota. As gotas foram cobertas com óleo mineral e incubadas nas mesmas condições atmosféricas da MIV, por um período de 18 horas.

#### ***Cultivo in vitro (CIV) dos embriões bovinos***

Após a FIV (dia 0; D0), os possíveis zigotos foram submetidos à sucessivas pipetagens, utilizando-se micropipeta automática para a retirada total das células do *cumulus oophorus*. Posteriormente, os embriões foram cultivados *in vitro* por sete dias em gotas de 70µL de meio *Synthetic Oviduct Fluid Medium* (SOF) suplementado com BSA (50mg/mL), amicacina (1µL/mL), piruvato (2µL/mL) e SFB (25µL/mL). As gotas de meio de cultivo, contendo os zigotos, foram cobertas por óleo mineral em ambiente de incubadora a 38,5°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 95% de umidade. Tentando-se mimetizar o ambiente da tuba uterina *in vivo*, embriões foram cultivados dentro de sacos plásticos inflados com mistura de gases (5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 95% de N<sub>2</sub>).

#### ***Avaliação das taxas de clivagem e de produção in vitro de embriões bovinos***

No segundo dia de cultivo (D2), os embriões foram retirados da estufa incubadora para avaliação da taxa de clivagem, ou seja, do número de estruturas com pelo menos uma clivagem, dividida pelo número total de oócitos inseminados. Além disso, ao final do cultivo, no D7, foi avaliada a taxa de produção de blastocistos. Todos os blastocistos viáveis foram lavados em solução PBS + BSA (1%), fixados em paraformaldeído 4%, e armazenados a 4°C em microtubos com 400µL de PBS + BSA (1%), para posteriores avaliações.

### ***Avaliação do dano de DNA pelo método de TUNEL***

Ao final de todas as rotinas laboratoriais de produção *in vitro* de embriões, todos os embriões no estágio de blastocisto expandido (Bx), dos cinco diferentes tratamentos, foram retirados da geladeira para realização protocolo de TUNEL, para detecção de fragmentação de DNA das células embrionárias.

Os embriões fixados foram permeabilizados em solução de Triton X-100 (2%) por cinco minutos, com posterior lavagem em duas gotas de PBS + BSA (0,01g) por cinco minutos em cada uma. Em seguida, foram incubados em solução contendo tampão equilíbrio, *mix* de nucleotídeos e enzima rTdT por 1 hora a 37°C, em incubadora com atmosfera umidificada.

Em paralelo, foram confeccionados os controles, positivo e negativo, da reação de TUNEL. O primeiro, tratado com DNase antes de ser incubado e, o segundo, substituindo-se a enzima rTdT por água Milli-Q para não ocorrer a reação. Após o período de incubação, os embriões foram lavados e depositados em lâminas próprias para este tipo de técnica, juntamente com solução de glicerol e 10µL/mL de Hoechst 33342. Para observação e contagem de células viáveis e células com danos DNA, utilizou-se microscópio de fluorescência (aumento 400X) e o *software* Leica. O número total de células foi obtido utilizando-se filtro de cor azul (460nm), observando-se as células coradas pelo Hoechst. Em contrapartida, células que sofreram danos de DNA durante a PIVE foram identificadas pela fluoresceína, corando-se de verde, sendo observadas em filtro verde (520nm). O número de células com danos de DNA foi contado com auxílio do programa computacional ImageJ (Schneider *et al.*, 2012).

### ***Taxa de maturação nuclear de oócitos bovinos incubados em meios contendo diferentes concentrações de fulerol***

Três rotinas foram realizadas para determinar a taxa de maturação nuclear dos diferentes tratamentos. Após 24 horas de maturação em incubadora, cinco oócitos grau 1 de cada tratamento e em três repetições foram lavados, incubados em solução de hialuronidase (2mg/mL) a 38,5°C por cinco minutos, e desnudados por meio de sucessivas pipetagens. Prontamente, esses oócitos desnudos foram fixados em paraformaldeído 4%, incubados por cinco minutos em solução Hoechst 33342 (1µL/mL em PBS), lavados por três vezes em PBS+BSA (0,01g) e depositados em lâmina para avaliação em microscópio de fluorescência (filtro azul 460nm; aumento 400X) com auxílio do *software* Leica.



### ***Análises Estatísticas***

O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado. As taxas de clivagem e de produção de blastocistos, de acordo com a rotina laboratorial, foram consideradas como unidades de observação. Os dados foram previamente submetidos a análises para verificação de normalidade e homocedasticidade, segundo teste de Kruskal-Wallis. Nas análises das taxas de clivagem, de produção total de embriões/número de clivados e de produção total de embriões/total de oócitos cultivados, de maturação e de apoptose, nos diferentes tratamentos experimentais, procedeu-se pelo teste Exato de Fisher, utilizando-se o programa estatístico *GraphPad InStat* versão 3.0. Para a avaliação do número total de blastômeros e número total de células apoptóticas nos embriões produzidos *in vitro* foi realizada ANOVA e teste de Student Newman Keuls a 5% de significância (SAEG 9.1, UFV, Viçosa, MG).

### **Resultados e Discussão**

#### ***Taxas de clivagem e produção de embriões bovinos produzidos in vitro com meios contendo diferentes concentrações de fulerol***

As taxas de clivagem, de produção de embriões em relação ao número de zigotos clivados e de produção de embriões/total de oócitos cultivados, de acordo com cada grupo experimental, estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Taxas de clivagem, de produção de embriões/clivados e de produção de embriões/total de oócitos bovinos cultivados *in vitro* em meios contendo diferentes concentrações de fulerol.

| Tratamento       | Número total de oócitos inseminados | Taxa de clivagem (%) | Taxa de produção de embriões/clivados (%) | Taxa produção de embriões/total de oócitos (%) |
|------------------|-------------------------------------|----------------------|---|--|
| Grupo Controle   | 461                                 | 73,96% a             | 40,76% a                                  | 30,15% a                                       |
| 1 nM de fulerol  | 461                                 | 73,53% a             | 36,87% ab                                 | 27,11% ab                                      |
| 10 nM de fulerol | 439                                 | 73,12% a             | 32,71% b                                  | 23,91% b                                       |
| 50 nM de fulerol | 451                                 | 76,94% a             | 40,34% a                                  | 31,04% a                                       |

<sup>a,b</sup>Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna, diferem entre si pelo Teste Exato de Fisher (P<0,05).

Conforme demonstrado na Tabela 2, a presença do Fullerol nas diferentes concentrações no meio de maturação *in vivo* não interferiu ( $P > 0,05$ ) na taxa de clivagem embrionária. Por outro lado, a taxa de produção de blastocistos, avaliada no sétimo dia de cultivo embrionário (D7), diferiu ( $P < 0,05$ ) entre os grupos experimentais. O grupo controle e o tratamento 4 (50nM) obtiveram taxas de produção de blastocisto superiores ( $P < 0,05$ ) ao tratamento 3 (10nM). O tratamento 2 (10nM) não diferiu ( $P > 0,05$ ) dos demais, sendo semelhantes aos tratamentos 1, 3 e 4.

Usando outros modelos biológicos, Yin *et al.* (2009) utilizaram fullerol nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu$ M em pré-tratamento de células endoteliais de capilares cerebrais de ratos, por 24 horas, antes de lavar as células e adicioná-las por 2 horas em meios com diferentes tipos de EROs:  $H_2O_2$ ,  $O^{2-}$  e  $OH^-$ . Ao final do trabalho, os autores verificaram diminuição da intensidade dos sinais dos três EROs, por ressonância eletrônica, demonstrando a capacidade antioxidante do fullerol.

Em um estudo visando demonstrar a ação antioxidante do fullerol em cardiomiócitos isolados de ratos neonatos, Ladeira (2013) observou por microscopia confocal de fluorescência que, após adição de fenilefrina ao meio, um agonista adrenérgico que está relacionado com o aumento da produção de EROs, houve aumento significativo da fluorescência, demonstrando elevada concentração de EROs que, *in vivo*, poderia levar o animal a importantes lesões cardíacas. Por outro lado, ao realizar o cultivo dessas células com fenilefrina e adição de fullerol (10nM), houve diminuição de aproximadamente 20% na fluorescência, demonstrando o alto poder antioxidante do fullerol em cardiomiócitos.

Sergeeva *et al.* (2019) observaram que a ação antioxidante dos fullerenos é influenciada por sua estrutura anatômica, seu tamanho, e pelos tipos de ligantes associados à nanopartícula. Além disso, os autores demonstraram dois tipos de resposta à adição de diferentes concentrações de fullereno  $C_{60}$  (4nM, 0,4 $\mu$ M, 4 $\mu$ M, 20 $\mu$ M) ao cultivo de fibroblastos de tecido pulmonar embrionário humano (HELFs): uma ação antioxidante, quando cultivados por até uma hora na presença das diferentes concentrações de fullereno, demonstrando sua habilidade em neutralizar EROs; e uma ação pró-oxidante em cultivos de HELFs suplementados com fullereno por mais de 24 horas, o que resultou em produção elevada de EROs.

A adição de fulerol ao meio de maturação *in vitro* de embriões bovinos não aumentou as taxas de clivagem e de produção de blastocistos. Os dados obtidos no presente trabalho descartam possível toxicidade do fulerol. A redução da produção de blastocistos em concentração de 10nM e o aumento dessa taxa na concentração de 50nM, além da influência do tempo de exposição celular ao fulerol (Sergeeva *et al.*, 2019), sugerem possível mecanismo dose e tempo-dependente do fulerol quanto sua propriedade antioxidante, podendo atuar como pró-oxidante, em doses mais baixas e cultivos prolongados. Estudos complementares, investigando a propriedade antioxidante do fulerol em cultivo *in vitro* de embriões bovinos ainda se fazem necessários.

### ***Contagem de células totais e células com dano de DNA pelo método de TUNEL***

A Tabela 3 apresenta a contagem total de células embrionárias, total de células apoptóticas, e proporção de células com danos a nível de DNA em relação ao número total de células de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*, em meios contendo diferentes concentrações de fulerol.

Tabela 3. Médias  $\pm$  desvios-padrão do número total de blastômeros, número total de blastômeros apoptóticos e percentual de células com danos de DNA em relação ao total de células de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* em meios contendo diferentes concentrações de fulerol.

| Tratamento       | Número total de blastômeros | Número total de blastômeros com danos de DNA | Número de blastômeros com DNA danificado/número de blastômeros totais (%) |
|------------------|-----------------------------|--|---|
| Grupo Controle   | 130,84 $\pm$ 44,76 a        | 8,52 $\pm$ 4,06 a                            | 7,43% a   |
| 1 nM de fulerol  | 129,78 $\pm$ 41,39 a        | 7,68 $\pm$ 4,38 a                            | 5,94% ab  |
| 10 nM de fulerol | 110,72 $\pm$ 40,06 a        | 7,54 $\pm$ 3,55 a                            | 6,98% ab  |
| 50 nM de fulerol | 134,05 $\pm$ 34,03 a        | 5,85 $\pm$ 4,32 a                            | 4,23% b   |

<sup>a,b</sup>Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Student Newman Keuls a 5% de significância.

Não houve efeito ( $P>0,05$ ) da adição de fulerol ao meio de maturação *in vitro* de oócitos sobre o número total de células e número total de células com danos de DNA de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. Porém, quando comparamos as proporções de células com DNA danificado sobre o número de células totais verifica-se diferença ( $P<0,05$ ) entre os tratamentos 1 (controle) e o tratamento 4 (50nM) (Figura 5), demonstrando que o fulerol teve efeito positivo sob a redução do dano de DNA das células embrionárias. Por outro lado, os tratamentos 2 (1nM) e 3 (10nM) obtiveram resultados semelhantes aos demais grupos experimentais.

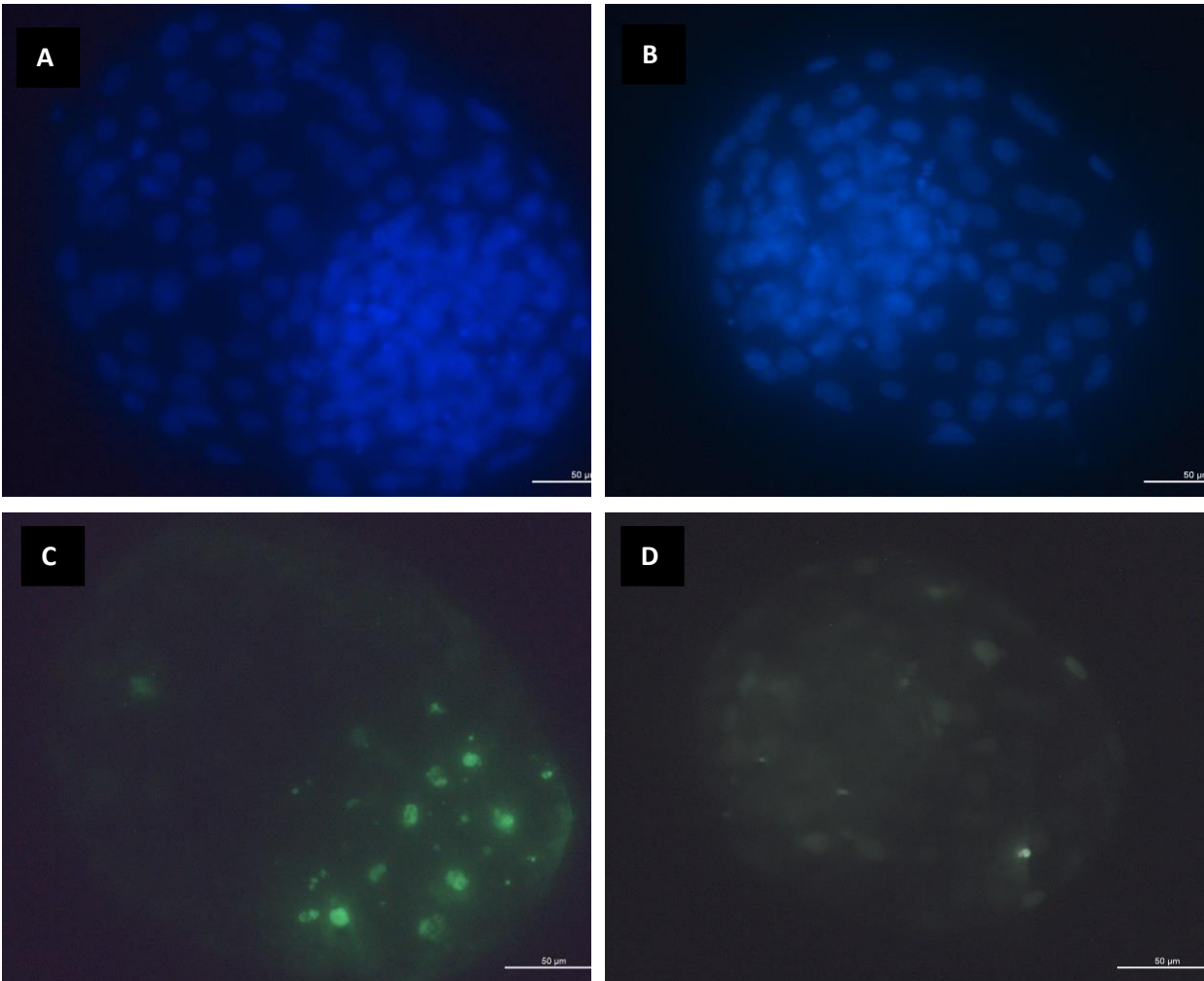


Figura 5. Blastocistos expandidos bovinos. As colunas representam imagens de um mesmo embrião produzido *in vitro* dos tratamentos 2 (A e C) e 4 (B e D), demonstrando o total de blastômeros corados pelo Hoechst (azul) observados em filtro de 460nm; e o total de células com dano de DNA (verde) observadas em filtro de 520nm, corados pela técnica *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling* Imagens obtidas por microscopia de fluorescência em aumento de 400x.

Dugan *et al.* (1996) utilizaram o fulerol como provável agente antioxidante neuroprotetor na dosagem de 100µM. O fulerol foi adicionado a culturas de neurônios corticais que passavam por privação sérica, processo que leva à produção exacerbada de radicais livres, a mudanças morfológicas e à morte celular. Os autores verificaram redução significativa de células com seu DNA danificado, sendo de 90% e 60% respectivamente para os grupos sem ou com a adição de 100µM de fulerol.

Ao adicionarem fulerol em um pré-tratamento de células do epitélio alveolar humano, por 24 horas antes de adicionarem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao meio de cultivo, Ye e colaboradores (2014) concluíram que ocorreu efeito inibitório ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reduzindo o dano de DNA celular e aumentando a viabilidade celular em até 40%, quando utilizado em doses de 100µM. O fulerol tem a capacidade de ativar e translocar o Nrf2, um fator de transcrição regulador da expressão de enzimas antioxidantes, para o núcleo celular. No núcleo, esse fator irá se ligar a um elemento de resposta antioxidante (ARE), ativando a transcrição de enzimas como a heme oxigenase-1 (HO-1),  $\gamma$ -glutamato-cisteína-ligase ( $\gamma$ -GCS) e quinona oxiredutase-1 (NQO-1), que irão conferir maior proteção à célula contra efeitos oxidantes, além dos efeitos de captura de EROs já conhecidos do fulerol (Huang *et al.*, 2011).

#### ***Avaliação de maturação nuclear de oócitos por método de Hoechst***

Os oócitos foram classificados quanto ao estágio da meiose após 24 horas de maturação, sendo oócitos em estágio de vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) e metáfase II (MII) (Figura 6) (Tabela 4). A porcentagem de oócitos maturados, ou seja, em estágio de MII foi de aproximadamente 50% em todos os grupos, não se diferenciando estatisticamente ( $p>0,05$ ).

Tabela 4. Efeito da adição do fulerol em diferentes concentrações sobre a taxa de maturação nuclear de oócitos bovinos cultivados *in vitro*.

| Tratamento      | Oócitos (n) | VG n (%)  | QVG n (%) | MI n (%)   | MII n (%)  |
|-----------------|-------------|-----------|-----------|------------|------------|
| Grupo Controle  | 15          | 4 (20,0%) | 0 (0,0%)  | 3 (26,7%)  | 8 (53,3%)  |
| 1nM de fulerol  | 27          | 5 (18,5%) | 0 (0,0%)  | 9 (33,3%)  | 13 (48,2%) |
| 10nM de fulerol | 25          | 2 (8,0%)  | 1 (4,0%)  | 10 (40,0%) | 12 (48,0%) |
| 50nM de fulerol | 27          | 4 (14,8%) | 0 (0,0%)  | 14 (51,9%) | 9 (33,3%)  |

$P>0,05$ . Oócitos em vesícula germinativa (VG), quebra de vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI) e metáfase II (MII).

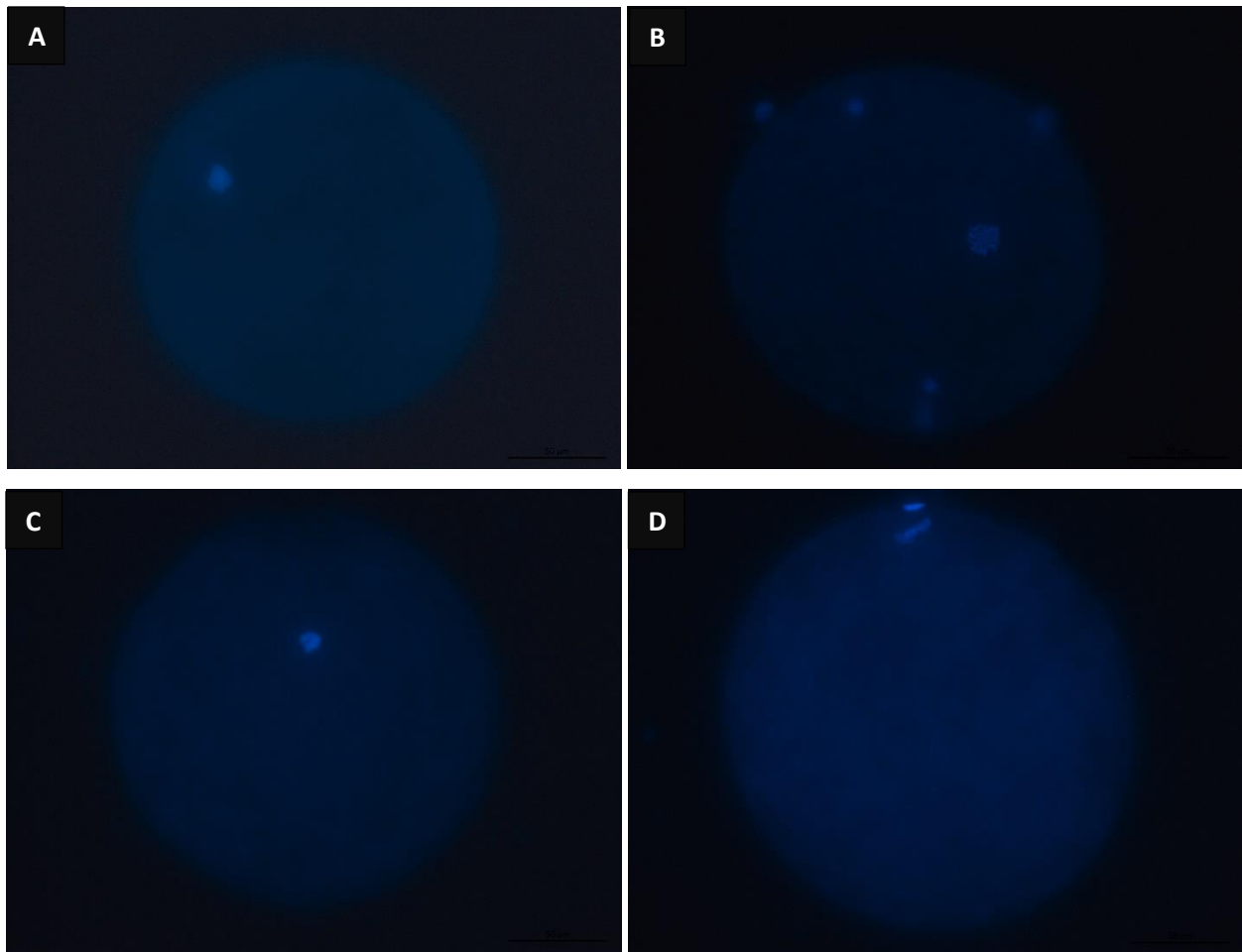


Figura 6. Marcação nuclear de oócitos bovinos corados com Hoechst, após 24 horas de maturação *in vitro*. Oócitos em estágio de vesícula germinativa (A), quebra de vesícula germinativa (B), metáfase I (C), metáfase II (D).

Os resultados de maturação, estratificando em oócitos maturados e não maturados, podem ser verificados no gráfico 1, obtendo-se uma classificação objetiva dos resultados. Mesmo não havendo diferença estatística ( $P > 0,05$ ), pode-se verificar que o tratamento 4 (50nM de fulerol) aparentemente apresentou quantidade de oócitos não maturados relativamente superior aos demais tratamentos, evidenciando um provável efeito bloqueador de maturação nuclear *in vitro* quando adicionadas concentrações mais elevadas.

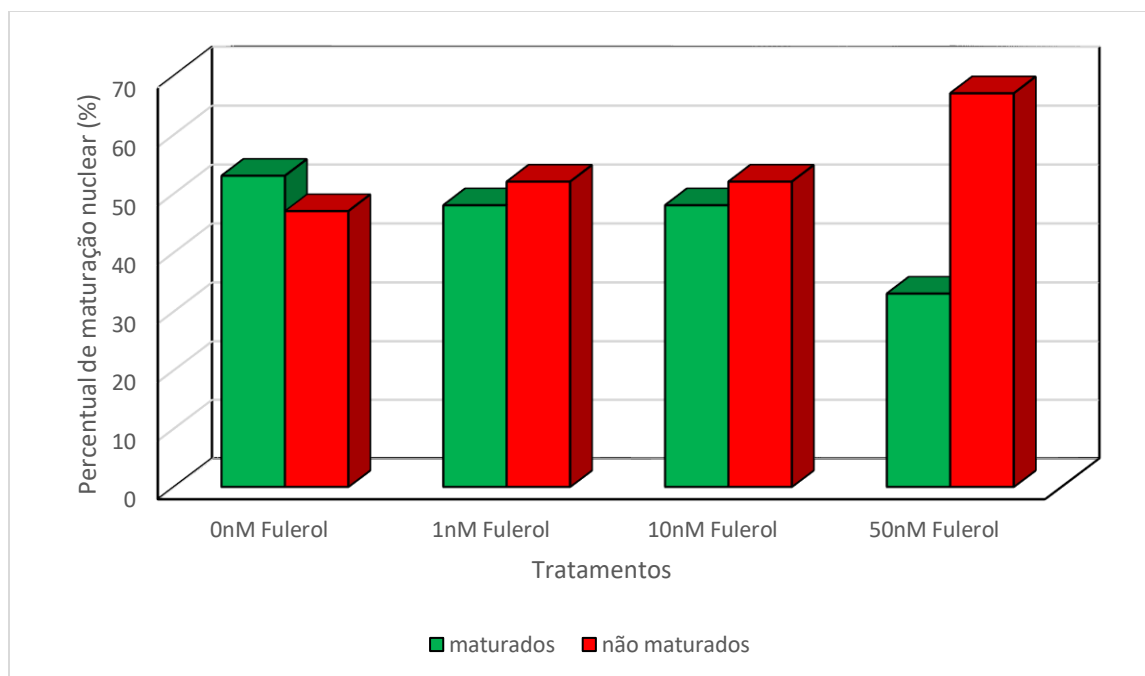


Gráfico 1. Taxa de maturação de oócitos bovinos cultivados *in vitro* com meios de maturação contendo diferentes concentrações de fulerol.

Após a aspiração dos folículos ovarianos, retirando os oócitos do ambiente folicular, ocorre remoção do sinal inibidor da progressão da meiose produzido pelas células da teca e/ou granulosas (Foote e Thibault, 1969; Kotsuji *et al.*, 1994; Sirard *et al.*, 1998), levando o folículo à maturação. Todavia, a maturação *in vitro* pode resultar em menor eficiência na produção embrionária, uma vez que nem todos os oócitos conseguem atingir a maturação citoplasmática adequada. Por isso, existem protocolos *in vitro* para controlar a maturação dos oócitos, permitindo que a grande maioria deles, após aspirados no laboratório ou em condições a campo por meio de OPU terminem a maturação nuclear sem afetar a qualidade dos mesmos, a fim de maximizar a produção de embriões (Adona e Leal, 2004; Schoevers *et al.*, 2005). O uso de inibidores farmacológicos, como por exemplo a butirolactona I em baixas concentrações (10 $\mu$ M) pode ser uma alternativa *in vitro* para um cultivo de pré-maturação antes de submeter os ovócitos à PIVE mantendo, de maneira reversível e temporária (Adona, 2006), os oócitos em estágio de vesícula germinativa. Isso permite ao oócito maior tempo para que sofra mudanças necessárias à aquisição da competência meiótica, visto que estes são submetidos à foliculogênese interrompida, haja vista terem sido removidos precocemente do ambiente folicular, ocorrendo a retomada espontânea da meiose.

Diante dos resultados sugestivos do presente experimento, novas pesquisas deverão ser conduzidas para esclarecer o possível papel do fulerol adicionado em elevadas concentrações nos meios de maturação *in vitro*, em retardar ou bloquear a maturação nuclear dos oócitos bovinos. Isso poderia contribuir para incrementar a produção embrionária.

### **Conclusões**

A adição do fulerol em meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos reduz o dano de DNA de blastômeros de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Observou-se queda do número de blastômeros com danos de DNA sobre o número de blastômeros totais no tratamento de mais alta concentração de fulerol.

### **Considerações Finais**

A adição do fulerol em meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos não alterou a taxa de clivagem, nem a produção de blastocistos, com exceção da concentração intermediária utilizada no trabalho (10nM), que apresentou queda na produção embrionária.

As diferentes concentrações de fulerol não alteraram o número total de blastômeros por embrião, tampouco o número de blastômeros com danos de DNA total.

A taxa de maturação nuclear observada pelo método de Hoechst não se diferenciou estatisticamente entre os tratamentos.

Mesmo não havendo diferença estatística, observou-se que altas concentrações de fulerol durante toda a etapa de maturação *in vitro* (24h) podem bloquear ou retardar o processo de maturação nuclear de oócitos bovinos.



## **Perspectivas Futuras**

O fulerol pode ser uma alternativa aos antioxidantes convencionais já utilizados na produção *in vitro* de embriões bovinos, principalmente por transpor certas limitações devido a sua alta estabilidade, alta reatividade, possibilidade de alcançar locais específicos e capacidade de ativar sistemas antioxidantes enzimáticos. Entretanto, estudos complementares investigando os mecanismos de atuação do fulerol como molécula antioxidante ou como estimulador de outros sistemas antioxidantes fisiológicos ainda se fazem necessários. Isso porque, ainda, carecemos investigar a dose ideal, o momento de inclusão nos meios de cultivo laboratoriais, e tempo de atuação da molécula no meio de maturação que seja benéfica e que, realmente, traga resultados satisfatórios à produção *in vitro* de embriões bovinos.

## Referências Bibliográficas

- ADONA, P.R. Bloqueio da meiose com butirolactona I em ovócitos bovinos: efeitos sobre a maturação nuclear e citoplasmática. 2006. 94f. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacases.
- ADONA, P.R.; LEAL, C.L.V. Meiotic inhibition with different cyclin-dependent kinase inhibitors in bovine oocytes and its effects on maturation and embryo development. *Zygote*. v.12, p.197–204, 2004.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. v.3, p.1-21, 2005.
- ALI, A. A.; BILODEAU, J. F.; SIRARD, M. A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology*. v.59, p.939-949, 2003.
- CHOUDHARY, K. K.; KAVYA, K. M.; JEROME, A.; SHARMA, R. M. Advances in reproductive biotechnologies. *Veterinary World*. v.9, p.388-395, 2016.
- CORREA, G. A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T. C. D.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Animal Reproduction Science*. v.104, p.132-142, 2008.
- COSTA, M. A. O uso das técnicas de transferência de embriões e fertilização in vitro em bovinos da raça gir, na associação dos produtores rurais da comunidade de Vista Alegre-Aprovista. Cáceres-Mato Grosso: Universidade do Estado de Mato Grosso; v.1, p.14-17, 2009.
- CROCOMO, L. F.; MARQUES FILHO, W. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; BICUDO, S. D. Produção de embriões in vitro: estresse oxidativo e antioxidantes. *Veterinária e Zootecnia*. v.19, p.470-479, 2012.
- DJORDJEVIC, A.; BOGDANOVIC, G.; DOBRIC, S. Fullerenes in biomedicine. *Journal of the Balkan Union of Oncology*. v.11, p.391-404, 2006.
- DJORDJEVIC, A.; SRDJENOVIC, B.; SEKE, M.; PETROVIC, D.; INJAC, R.; MRDJANOVIC, J. Review of synthesis and antioxidant potential of fullereneol nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*. v.1, p.1-15, 2015.

- DUNGAN, L. L.; GABRIELSEN, J. K.; YU, S.P.; LIN, T. S.; CHOI, D. W. Buckminsterfullerenol free radical scavengers reduce excitotoxic and apoptotic death of cultured cortical neurons. *Neurobiology of Disease*. v.3, p.129-135, 1996.
- FOOTE, W.D.; THIBAUT, C. Recherches experimentales sur la maturation in vitro des ovocytes de truie et de veau. *Annales of Biologie Animale Biochimie Biophysique*. v.3, p.329-349, 1969.
- GONÇALVES, P. B D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.31, p.212-217, 2007.
- GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, E. I.; MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*. v.7, p.175-89, 2001.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 2ed. *Clarendon Press*. Oxford, p.22-85, 1989.
- HANSEN, P. J. Realizing the promise of IVF in cattle – an overview. *Theriogenology*. v. 65, p.119-125, 2006.
- HELMUT, S. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*. v.215, p.213-219, 1993.
- HUANG, T. C.; CHUNG, Y. L.; CHUANG, S. M. Cinnamaldehyde enhances Nrf2 nuclear translocation to upregulate phase II detoxifying enzyme expression in HepG2 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.59, p. 5164-5171, 2011.
- IETS. 2016 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *IETS Data Retrieval Committee*. p.9, 2016.
- JENSEN, A. W.; WILSON, S. R.; SCHUSTER, D. I. Biological applications of fullerenes – A review. *Bioorganic and Medical Chemistry*. v.4, p. 767-779, 1996.
- KATO, S.; AOSHIMA, H.; SAITOH, Y.; MIWA, N. Highly hydroxylated or  $\gamma$ -cyclodextrin-bicapped water-soluble derivative of fullerene: the antioxidant ability assessed by electron spin resonance method and  $\beta$ -carotene bleaching assay. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. v.19, p.5293-5296, 2009.
- KITAGAWA, Y.; SUZUKI, K.; YONEDA, A.; WATANABE, T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*. v. 62, p.1186-97, 2004.

- KOTSUJI, F.; KUBO, M.; TOMINAGA, T. Effect of interactions between granulosa and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. v.100, p.151-156, 1994.
- KROTO, H. W.; HEATH, J. R.; O'BRIEN, S. C.; CURL, R. F.; SMALLEY, R. E. C<sub>60</sub> Buckminsterfullerene. *Nature*. v.318, p.162-163, 1985.
- LADEIRA, M. S. Nanotecnologia aplicada ao sistema cardiovascular: Efeito do fullerol no estresse oxidativo. 2013. 114f. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- LADEIRA, M. S.; ANDRADE, V. A.; GOMES. Highly efficient siRNA delivery system into human and murine cells using single-wall carbon nanotubes. *Nanotechnology*. v.38, 2010.
- LAI, H. S.; CHEN, W. J.; CHIANG, L. Y. Free radical scavenging activity of fullerene on the ischemia-reperfusion intestine in dogs. *World Journal of Surgery*. v.24, p.450-454, 2000.
- LEITE, A. C. Viabilidade pós vitrificação de embriões F1 Holandês x Zebu produzidos *in vitro* e cultivados em meio contendo ácido linoléico conjugado. 2014. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- LIANG, F.; QI, S.; XIAN, Y.; HUANG, L.; SUN, X.; WANG, W. Protective effect of antioxidants on the pre-maturation aging of mouse oocytes. *Scientific Reports*. v.7, p1-10, 2017.
- LIANG, S.; LINGSHIUE, Y.; JENKUO, C.; ERGUO, S.; TINGLIAO, W.; MEITSAI, E. Online monitoring oxidative products and metabolites of nicotine by free radicals generation with fenton reaction in tandem mass spectrometry. *The Scientific World Journal*. v.2013, p.1-8, 2013.
- LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reproductive Biology*. v.5, p5-17, 2005.
- MASHINO, T.; OKUDA, K.; HIROTA, T.; HIROBE, M.; NAGANO, T.; MOCHIZUKI, M. Inhibition of *E. coli* growth by fullerene derivatives and inhibition mechanism. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters*. v.9, p.2959-2962, 1999.
- MELLO FILHO, A. C.; HOFFMAN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochemistry Journal*. v.5, p.218-273, 1983.

- MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S. L. G.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.40, n.2, p.58-64, 2016.
- MENDES, R. M.; SILVA, G. A.; CALIARI, M. V. SILVA, E. E.; LADEIRA, L. O.; FERREIRA, A. J. Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. *Life Science*. v.87, p.215-222, 2010.
- RAHME, L. S. T. R. Efeito do ácido linoléico conjugado na sobrevivência pós criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. 2012. 42f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. v.9, p.671-675, 2012.
- SCHOEVERS, E.J.; BEVERS, M.M.; ROELEN, B.A.J.; COLENBRANDER, B. Nuclear and cytoplasmic maturation of sow oocytes are not synchronized by specific meiotic inhibition with roscovitine during *in vitro* maturation. *Theriogenology*. v.63, p.1111–1130, 2005.
- SERGEEVA, V.; KRAEVAYA, O.; ERSHOVA, E.; KAMENEVA, L.; MALINOVSKAYA, E.; DOLGIKH, O.; KONKOVA, M.; VORONOV, I.; ZHILENKOV, A.; VEIKO, N.; TROSHIN, P.; KUTSEV, S.; KOSTYUK, S. Antioxidant properties of fullerene derivatives depend on their chemical structure: a study of two fullerene derivatives on HELFs. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. v.2019, p.13, 2019.
- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology*. v.49, p.483-497, 1998.
- TAKADA, H.; KOKUBO, K.; MATSUBAYASHI, K.; OSHIMA, T. Antioxidant activity of supramolecular water-soluble fullerenes evaluated by  $\beta$ -Carotene bleaching assay. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. v.70, p.3088-3093, 2006.
- TSAI, M. C.; CHEN, Y. H.; CHIANG, L. Y. Polyhydroxylated C60, fulleranol, a novel free-radical trapper, prevented hydrogen peroxide and cumene hydroperoxide-elicited changes in rat hippocampus *in vitro*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. v.49, p.438-445, 1996.
- UENO, H.; YAKAMURA, S.; ARASTOO, R. S.; OSHIMA, T.; KOKUBO, K. Systematic evaluation and mechanistic investigation of antioxidant activity of fullerenols using carotene bleaching assay-carotene bleaching assay. *Journal of Nanomaterials*. vol.2014, p.7, 2014.

- VARAGO, F. C. Efeito da adição da sacarose ao meio para vitrificar embriões zebuínos produzidos *in vitro*. 2005. 46p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal). Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, MG.
- VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.32, p.100-109, 2008.
- VIANA, J.H.M. Mudanças e tendências no mercado de embriões bovinos no Brasil. *O Embrião*. v. 42, p.05-07, 2009.
- WANG, Z. G.; YU, S. D.; XU, Z. R. Effect of supplementation of green tea polyphenols on the development competence of bovine oocytes *in vitro*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v.40, p.1079-1085, 2007.
- XIAO, L.; TAKADA, H.; GAN, X.; MIWA, N. The water-soluble fullerene derivative “Radical Sponge” exerts cytoprotective action against UVA irradiation but not visible-light-catalyzed cytotoxicity in human skin keratinocytes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. v.16, p.1590-1595, 2006.
- YE, S.; CHEN, M.; JIANG, Y.; CHEN, M.; ZHOU, T.; WANG, Y.; HOU, Z.; REN, L. Polyhydroxylated fullerene attenuates oxidative stress-induced apoptosis via a fortifying Nrf2-regulated cellular antioxidant defence system. *International Journal of Nanomedicine*. v.9, p.2073-2087, 2014.
- YIN, J.; LAO, F.; FU, P. P.; WAMER, W. G.; ZHAO, Y.; WANG, P. C.; QIU, Y.; SUN, B.; XING, G.; DONG, J.; LIANG, X.; CHEN, C. The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials. *Biomaterials*. v.30, p.611-621, 2009.
- ZHU, Z.; SCHUSTER, D. I.; TUCKERMAN, M. E. Molecular dynamics study of the connection between flap-closing and binding of fullerene-based inhibitors of the HIV-1 protease. *Biochemistry*. v.42, p.1326-1333, 2003.