

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Efeito da suplementação com tretinoína nanoencapsulada na produção *in vitro*
de embriões bovinos**

Caroline Gomes Lucas

Pelotas, 2014

Caroline Gomes Lucas

Efeito da suplementação com tretinoína nanoencapsulada na produção *in vitro* de embriões bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Collares

Comitê de orientação: Dra. Priscila Marques Moura de Leon
Dra. Fabiana Kommeling Seixas
Dr. Vinicius Farias Campos

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

L933e Lucas, Caroline Gomes

Efeito da suplementação com tretinoína
nanoencapsulada na produção in vitro de embriões bovinos
/ Caroline Gomes Lucas ; Tiago Veiras Collares, orientador.
— Pelotas, 2014.

66 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia, Centro de Ciências Químicas,
Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de
Pelotas, 2014.

1. Oócitos bovinos. 2. Maturação in vitro (miv). 3.
Espécies reativas de oxigênio (eros). 4. Nanoembriologia.
I. Collares, Tiago Veiras, orient. II. Título.

CDD : 591.15

Elaborada por Maria Beatriz Vaghetti Vieira CRB: 10/1032

Caroline Gomes Lucas

Efeito da suplementação com tretinoína nanoencapsulada na produção *in vitro* de embriões bovinos

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 19/02/2014.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Tiago Veiras Collares (orientador).
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr^a. Priscila Marques Moura de Leon (co-orientadora).
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Alan John Alexander McBride
Doutor em Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada pela Universidade de Manchester, Instituto de Ciência e Tecnologia (UMIST)

Prof. Dr^a. Carine Dahl Corcini
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho a Priscila de Leon, Eliza Rossi e Mariana Remião que estiveram sempre ao meu lado, enfrentando todos os desafios durante esta caminhada.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Mara e Gomercindo e ao meu irmão, Mateus, pelo incentivo incondicional, dedicação e apoio constante. Ao Prof. Ruy Beck e a equipe da UFRGS, pela síntese e caracterização da tretinoína nanoencapsulada e da suspensão de nanocápsulas, permitindo a realização deste experimento. Ao meu orientador Prof. Dr. Tiago Collares por acreditar no meu trabalho, pelas cobranças e desafios impostos que serviram de estímulo para que eu pudesse alcançar os objetivos propostos. A Prof. Dra. Fabiana Seixas pelas oportunidades proporcionadas, conselhos e conhecimentos adquiridos, ao Prof. Dr. Vinicius Campos e a pós-doutoranda Helena Thurow pelas opiniões e sugestões durante a realização deste trabalho e pelas contribuições em estatística.

A Priscila de Leon, Eliza Rossi e Mariana Remião pelo companheirismo em todos os momentos, sempre incansáveis e prontas para enfrentarem qualquer desafio, fazendo tudo ficar mais fácil. Obrigada por todos os ensinamentos técnicos, apoio e paciência. Ao William Domingues e Cristina Haas pela ajuda, motivação e boas risadas. A Eduarda Shultze pelas dúvidas solucionadas e dicas. Aos colegas do Grupo de Oncologia Molecular, por fazerem a minha rotina ser mais divertida e o ambiente de trabalho um local harmonioso, pelas discussões científicas e não científicas.

À direção e aos funcionários do Grupo Marfrig e frigoríficos Rollof e Famile pelo fornecimento dos ovários, viabilizando a realização deste trabalho.

A aos meus amigos Patrícia, Leina, Camila, Giovanni e Thaís que inúmeras vezes aguentaram minhas reclamações, pelo afeto e compreensão.

Resumo

Lucas, Caroline. **Efeito da suplementação com tretinoína nanoencapsulada na produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2014. 66f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

A possibilidade de aumento do padrão genético e da produção animal torna a produção *in vitro* (PIV) de embriões uma técnica extremamente valiosa para o desenvolvimento tecnológico da pecuária. No entanto, devido a necessidade de uma mimetização do processo *in vivo*, que consiste em várias etapas interdependentes, há dificuldades em ajustar as condições ótimas requeridas para cada situação reproduzida. O melhoramento dos protocolos de maturação *in vitro* (MIV) através da suplementação com diferentes moléculas permite aumentar a eficiência dos meios de cultivo e melhorar a competência de oócitos para a fertilização e embriogênese. Uma abordagem altamente promissora é a realização da entrega de moléculas mediada por nanocarreadores. A tretinoína (TTN, ácido retinóico all-*trans* - ATRA) é um retinóide natural e metabólito ativo da vitamina A, com ação importante na proliferação e diferenciação celular, e no desenvolvimento embrionário tanto em condições *in vivo* como *in vitro*. A TTN age no processo de maturação citoplasmática, no desenvolvimento inicial embrionário e competência oocitária melhorando a qualidade dos embriões gerados. A associação da tretinoína à nanopartículas poliméricas surge como alternativa para melhorar a solubilidade e estabilidade química desta molécula, possibilitando uma liberação controlada e redução da degradação. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação com nanocápsulas de núcleo lipídico associadas à tretinoína (TTN-LNC) no meio de MIV, nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1 μM , através da análise do desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e expressão de genes relacionados a apoptose e pluripotência. Como principais resultados, a TTN-LNC a 0,25 μM aumentou a taxa de produção de blastocistos e reduziu a produção de EROs. Além disso, TTN e TTN-LNC induziram uma menor expressão dos genes *Bax* e *SHC1* sugerindo efeitos benéficos sobre o desenvolvimento embrionário. Os resultados indicam que a nanoencapsulação permite a utilização de uma menor dose de TTN-LNC com consequente obtenção de maiores porcentagens de produção de blastocistos e diminuição da produção de EROs, tornando a nanoembriologia uma ferramenta potencial para a melhora da técnica de PIV de embriões bovinos.

Palavras-chave: oócitos bovinos; maturação *in vitro* (MIV); espécies reativas de oxigênio (EROs); nanoembriologia;

Abstract

Lucas, Caroline. **Effects of supplementation with tretinoin nanocoated in bovine embryos *in vitro* produced.** 2014. 66f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

The possibility of increasing the genetic pattern and animal production make the *in vitro* production of embryos an extremely valuable technique for the technological development of livestock. However, due to the need for mimicking the *in vivo* process, that consists in several interdependent steps there are difficulties in setting the optimal conditions for each situation performed. The improvement of *in vitro* maturation (IVM) protocols through supplementation with different molecules can increase the efficiency of the culture medium and improve the competence of oocytes for fertilization and embryogenesis. A promising approach is the realization of mediated delivery of nanocarriers molecules. Tretinoin (TTN, all- *trans* retinoic acid - ATRA) is a natural retinoid and active metabolite of vitamin A with important action in cell proliferation and differentiation and embryonic development under both *in vivo* and *in vitro* conditions. TTN acts on the cytoplasmic maturation process, in the initial embryonic development and oocyte competence, improving the quality of embryos generated. The combinations of tretinoin with polymeric nanoparticles are alternatives to enhance the solubility and chemical stability of this molecule, allowing controlled release and decreased degradation. The objective of this study was to evaluate the effects of IVM medium supplementation with tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules (TTN-LNC) at concentrations of 0.25, 0.5 and 1 μM , by analysis of embryonic development until the blastocyst stage, production of reactive oxygen species (ROS), and expression of genes related to apoptosis and pluripotency. As main results, TTN-LNC 0.25 μM increased the rate of blastocyst production and reduced ROS production. In addition, TTN and TTN-LNC induced a lower gene expression of *Bax* and *SHC1*, suggesting beneficial effects on the development of embryos. The results indicate that nanoencapsulation allows the use of a lower dose of TTN-LNC with consequent obtention of higher percentages of blastocyst production and decreased production of ROS, making nanoembriology a potential tool for improving bovine embryos IVP.

Keywords: bovine oocytes; *in vitro* maturation (IVM); ROS; nanoembriology;

Lista de Figuras

Figura 1	Produção de espécies reativas de oxigênio em embriões produzidos em meio de maturação <i>in vitro</i> suplementado com tretinoína (TTN) e nanocápsulas de núcleo lipídico associadas à tretinoína (TTN-LNC).....	40
Figura 2	Perfil de expressão de genes relacionados à apoptose em blastocistos bovinos produzidos em meio de maturação <i>in vitro</i> suplementado com tretinoína (TTN) e nanocápsulas de núcleo lipídico associadas à tretinoína (TTN-LNC).....	42
Figura 3	Perfil de expressão de genes relacionados à pluripotência em blastocistos bovinos produzidos em meio de maturação <i>in vitro</i> suplementado com tretinoína (TTN) e nanocápsulas de núcleo lipídico associadas à tretinoína (TTN-LNC).....	43

Lista de Tabelas

Tabela 1	<i>Primers</i> utilizados para reação de PCR em tempo real.....	36
Tabela 2	Desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões bovinos oriundos de oócitos maturados <i>in vitro</i> na presença de diferentes concentrações de tretinoína (<i>TTN</i>) e nanocápsulas de núcleo lipídico associadas à tretinoína (<i>TTN-LNC</i>).....	39

Lista de abreviações

AMPC- monofosfato cíclico de adenosina
AR- ácido retinóico
ATP- trifosfato de adenosina
ATRA- ácido retinóico all-*trans*
BSA- albumina sérica bovina
CC- células do *cumulus*
cDNA- ácido desoxirribonucleico complementar
CCO- complexo *cumulus*-oócito
COC- *cumulus* oophorus cell
CIV- cultivo *in vitro*
CP- corpúsculo polar
DNA- ácido desoxirribonucleico
EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs- espécies reativas de oxigênio
FFb- fluido folicular bovino
FIV- fertilização *in vitro*
FSH- hormônio folículo estimulante
GC- grânulos corticais
GMPc- monofosfato cíclico de guanosina
GSH- glutathione
hCG- *Human Chorionic Gonadotropin*
LNC - nanocápsulas de núcleo lipídico
LH- hormônio luteinizante
MAPK- MAP quinase
MIV- maturação *in vitro*
MK- midkine
MOS-proteína proto-oncogênica *c-mos*
MPF- fator promotor da maturação
mRNA- RNA mensageiro
PDE3-fosfodiesterase-3
PIV- produção *in vitro* de embriões

PVA- álcool polivinílico

PVP- polivinil pirrolidona

QVG- quebra da vesícula germinativa

RAREs- elementos responsivos ao ácido retinóico

RE- retículo endoplasmático

RNA- ácido ribonucléico

SFB- soro fetal bovino

SOF- *synthetic oviductal fluid*

TCM-199- meio de cultivo tecidual 199

TTN- tretinoína livre

TTN-LCNC- nanocápsulas de núcleo lipídico associadas à tretinoína

VG- vesícula germinativa

Sumário

1 Introdução	14
2 Revisão.....	16
2.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	16
2.2 Maturação oocitária.....	17
2.3 Suplementação de meios para a maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos.....	19
2.4 Tretinoína.....	21
2.5 Nanotecnologia.....	23
3 Objetivos.....	25
4 Artigo.....	26
5 Conclusão.....	53
Referências.....	54

1.INTRODUÇÃO

A utilização de biotécnicas da reprodução empregadas a bovinos tem se expandido nos últimos anos com a finalidade de melhorar as taxas reprodutivas de fêmeas de alto valor genético e com isso aumentar o padrão genético do rebanho (CAMARGO et al., 2003). Porém, há mais de duas décadas, as taxas de desenvolvimento *in vitro* de blastocistos em meios de cultivo simples permanecem baixas, variando de 20 a 40% na espécie bovina (FUKUI et al., 1991; LIU; FOOTE, 1995; LONERGAN; FAIR, 2008). Vários fatores incluindo o próprio oócito, as células somáticas, as fontes de proteínas, os meios de cultivo, a tensão de oxigênio e os substratos energéticos podem afetar o desenvolvimento *in vitro* de embriões pré-implantacionais (BAVISTER, 1995; JANG et al., 2010). Dessa forma, o melhoramento dos protocolos de maturação *in vitro* (MIV) através da suplementação com diferentes hormônios, vitaminas e outras moléculas torna-se necessário para aumentar a eficiência dos meios e permitir que oócitos imaturos adquiram competência para a fertilização e embriogênese (ABE; HOSHI, 2003; DUQUE et al., 2002; HIDALGO et al., 2003; TAHA EI et al., 2011).

A suplementação com ácidos retinóicos (ARs) vem demonstrando efeitos benéficos na produção *in vitro* (PIV) de embriões. A tretinoína (TTN, ácido retinóico *all-trans*, ATRA), metabólito ativo da vitamina A (SOPRANO; QIN; SOPRANO, 2004), é considerada um dos mais importantes retinóides na embriogênese de vertebrados, tanto em condições *in vitro* como *in vivo* (MORRISS-KAY; WARD, 1999; TANG; GUDAS, 2011). A adição de TTN em meios para a PIV demonstrou gerar maiores taxas de maturação de oócitos desnudos de camundongos (NASIRI et al., 2011; TAHA EI et al., 2011) e de blastocistos bovinos (GOMEZ et al., 2003; RODRIGUEZ et al., 2006). Adicionalmente, estudos confirmam a presença de subtipos α e β do receptor retinóide X (RXR α , RXR β) para a TTN no oócito, nas células do *cumulus* (MOHAN; THIRUMALAPURA; MALAYER, 2003) e em blastocistos eclodidos (MOHAN et al., 2001; MOHAN et al., 2002; MOHAN; THIRUMALAPURA; MALAYER, 2003).

Apesar de existirem pesquisas relacionadas à função dos ARs, ainda pouco se conhece sobre a atividade da TTN na MIV dos complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) bovinos. A fim de avaliar a ação deste composto nessas condições, a utilização de nanocápsulas de núcleo lipídico associadas à tretinoína (TTN-LNC) surge como alternativa para a suplementação do meio de MIV. O nanoencapsulamento permite otimizar a eficácia de muitos agentes terapêuticos, protegendo-os da ocorrência de degradação e aumentando a biodisponibilidade intracelular e estabilidade química do composto (OURIQUE et al., 2010; SHAH et al., 2007).

Aliado a essa nova estratégia de nanoembriologia, a fim de investigar os efeitos da suplementação com TTN-LNC em meio de MIV, avaliamos as taxas de desenvolvimento embrionário, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em embriões de 2 a 4 células, e os níveis transcricionais de genes relacionados a apoptose e pluripotência em blastocistos.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PIV de embriões bovinos

A possibilidade de aumento do padrão genético e da produção animal tornam a PIV de embriões uma técnica extremamente valiosa para o desenvolvimento tecnológico da pecuária, principalmente na área de reprodução (ABADIA, 2006). Dados recentes indicam que mundialmente em 2011 foram realizadas aproximadamente 374 mil transferências utilizando embriões produzidos *in vitro* (STROUD, 2012). No entanto, devido a necessidade de uma mimetização do processo *in vivo*, que consiste em várias etapas interdependentes, há dificuldades em ajustar as condições ótimas requeridas para cada situação reproduzida.

A PIV compreende três estágios, os quais consistem na MIV do oócito, fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) de embriões. A MIV envolve a coleta de oócitos em prófase I de folículos antrais, em conjunto com as células do *cumulus* (CC), e cultura durante 22 a 26h (GALLI et al., 2003). Após, a FIV é realizada através da co-incubação dos CCOs com os espermatozoides capacitados, em um período de 18 a 22h. Neste intervalo deve ocorrer ligação e penetração da célula espermática à zona pelúcida do oócito, através da reação acrossômica para posterior ativação do gameta feminino e formação dos pró-núcleos (SCHULTZ; KOPF, 1995). No cultivo embrionário os oócitos fertilizados, previamente desnudados, são incubados até os embriões atingirem o estágio de blastocisto e posteriormente são transferidos para as fêmeas receptoras (MACHATY; PEIPPO; PETER, 2012). Entretanto, a proporção de embriões que alcançam o estágio de blastocisto é raramente superior a 40% (DALVIT et al., 2005; FUKUI et al., 1991; LIU; FOOTE, 1995; LONERGAN; FAIR, 2008).

Segundo os dados presentes na literatura, embriões produzidos *in vitro* são inferiores em termos de qualidade quando comparados aos gerados *in vivo* (LONERGAN; FAIR, 2008) com base em dados de criotolerância, morfologia, metabolismo, perfis de expressão gênica, ocorrência de apoptose e taxas de prenhez após a transferência (LONERGAN et al., 2006; POMAR et al., 2005). Dessa forma, o aprimoramento dos protocolos de PIV, através da modificação de condições de cultivo e realização de suplementação com diferentes moléculas, surge como alternativa para aumentar a eficiência desta técnica (ABE; HOSHI, 2003; LIMA et al., 2006).

2.2. Maturação oocitária

A etapa de maturação oocitária é caracterizada pela ocorrência de transformações nucleares e citoplasmáticas, nas quais o oócito finaliza sua primeira divisão meiótica, progredindo do estágio de vesícula germinativa (VG) até metáfase II, redistribui as organelas e armazena RNAs mensageiros (mRNAs), proteínas e fatores transcricionais (FERREIRA et al., 2009).

Na maturação nuclear, ocorre a condensação da cromatina e rompimento da VG. Os centríolos são duplicados e ocorre migração dos cromossomos em pares diplóides para a região equatorial, caracterizando a metáfase I. Após, o citoplasma é dividido assimetricamente formando duas células filhas de tamanhos diferentes, uma contendo maior parte do citoplasma, constituindo o oócito secundário, e outra menor, expulsa para o espaço perivitelino, conhecida como corpúsculo polar (CP). Os cromossomos ainda contendo duas cromátides são novamente submetidos à meiose II, que progride até metáfase II, permanecendo o oócito secundário em repouso. Se ocorrer fertilização, o oócito é estimulado a finalizar a meiose II, gerando duas células, que correspondem ao ócito maturo e ao segundo CP, ambos apresentando um número haplóide de cromossomos (HYTTEL et al., 1997; GOTTARDI; MINGOTI, 2009).

A maturação nuclear é insuficiente para garantir um oócito capaz de ser fecundado e de sustentar o desenvolvimento embrionário, exigindo a ocorrência da maturação citoplasmática, em que o oócito sofre alterações estruturais e biológicas que o torna apto para ativação, formação do pronúcleo e desenvolvimento pré-implantacional (IZADYAR et al., 1998). Essas modificações podem ser resumidas em três eventos principais que são: a redistribuição das organelas citoplasmáticas, a dinâmica dos filamentos no citoesqueleto e a maturação molecular (FERREIRA et al., 2009)

Na redistribuição das organelas, a localização de mitocôndrias em áreas de alto consumo de energia (FERREIRA et al., 2009), o aumento três vezes maior da síntese de proteínas pelos ribossomos (TOMEK; TORNER; KANITZ, 2002), a exocitose de grânulos corticais (GC), que permitem através da sua migração a avaliação da maturação citoplasmática em oócitos de mamíferos (BÉZARD, 1997) e bloqueio da polispermia (HOSOE; SHIOYA, 1997), e a regulação da homeostase de cálcio pelo complexo de Golgi (MACHACA, 2007), são consideradas alterações estruturais e biológicas indispensáveis. O movimento de organelas citoplasmáticas e a separação dos cromossomos durante a meiose e mitose são responsáveis pela capacitação do oócito, permitindo a aquisição da competência nuclear (ALBARRACIN et al., 2005). A presença no citoesqueleto celular de três tipos de filamentos garante a resistência celular em resposta ao estresse, a modulação da expressão gênica e a produção de proteínas em células transcricionalmente inativas, como oócitos e embriões nos estágio inicial de desenvolvimento (GANDOLFI; BREVINI, 2010).

A maturação molecular irá permitir a transcrição, armazenamento e processamento dos mRNAs expressos pelos cromossomos (FERREIRA et al., 2009). Os principais transcritos produzidos durante a maturação molecular do CCO codificam para reguladores do ciclo celular como o fator promotor da maturação (MPF), a proteína proto-oncogênica *c-mos* (MOS) e a proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) (FERREIRA et al., 2009). Adicionalmente, outras moléculas importantes para o desenvolvimento e progressão da maturação e desenvolvimento embrionários são sintetizadas e acumuladas dentro do oócito, passando a serem consideradas marcadores da maturação citoplasmática. A enzima glutatona, juntamente a outras moléculas antioxidantes, é responsável pela proteção celular

contra danos oxidativos causados pela formação de EROs durante o metabolismo mitocondrial, e moléculas de adenosina trifosfato (ATP) parecem estar em quantidades maiores em oócitos morfologicamente competentes (ALI; BILODEAU; SIRARD, 2003; TARAZONA et al., 2006).

Em relação ao processo de MIV, a retirada dos CCOs interrompe o processo natural de manutenção do bloqueio meiótico, levando a uma insuficiente aquisição de competência oocitária e consequente maturação precoce. Segundo pesquisadores, o monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e monofosfato cíclico de guanosin (GMPc) estão diretamente envolvidos neste processo. Um estudo de Zhang et al. (2010) confirmou que a interação das células da granulosa com as CC e o consequente aumento dos níveis de GMPc no oócito, são responsáveis por manter o bloqueio meiótico. A onda de hormônio luteinizante (LH), ao induzir a interrupção da transferência de GMPc ao oócito, torna ativa a enzima fosfodiesterase-3 (PDE3), responsável por hidrolisar AMPc, que em níveis reduzidos leva ao reinício da meiose. Esta cascata de sinalizações, ao mesmo tempo em que caracteriza a maturação induzida pelo LH, justifica o porquê da maturação espontânea, acionada pela remoção física dos CCOs, não ser definida como um processo fisiológico e sim como um mecanismo que ocorre na tentativa de substituir o sinal normalmente associado com a onda de LH (SIRARD, 2011).

2.3. Suplementação de meios para a maturação *in vitro* de oócitos bovinos

O comprometimento da competência dos oócitos bovinos quando submetidos a condições artificiais de cultivo é considerado um entrave para o desenvolvimento das biotecnologias reprodutivas. Os meios de cultivo utilizados para a MIV, por serem formulações complexas originalmente produzidas para sustentar as necessidades metabólicas de células somáticas e tecidos, ainda não fornecem as condições necessárias para se atingir os níveis de eficácia obtidos no processo *in vivo* (CHIAMENTI et al., 2010; MINGOTI et al., 2009). Assim, as pesquisas na área de PIV de embriões bovinos estão concentrando seus esforços no melhoramento

dos protocolos de MIV testando diferentes hormônios, vitaminas, fatores de crescimento, antioxidantes e outras moléculas objetivando alcançar maior eficiência na fertilização e embriogênese (ELAMARAN et al., 2012;LIMA et al., 2006).

O meio de cultivo tecidual 199 (TCM-199) é o mais comumente usado no procedimento *in vitro* (FUKUI, 1989), porém, alguns grupos de pesquisa utilizam o *synthetic oviductal fluid* (SOF) destinado para o cultivo de embriões (ALI; SIRARD, 2002). O meio SOF é capaz de promover a MIV sem a presença de macromoléculas, porém, a qualidade dos embriões gerados é inferior aos originados de oócitos cultivados em TCM-199 (LONERGAN et al., 2003;RUSSELL et al., 2006). Estes meios servem como base para a suplementação com cisteamina, β -mercaptoetanol, fontes protéicas como soro fetal bovino (SFB) e albumina sérica bovina (BSA), gonadotropinas (LH, FSH e hCG- *Human Chorionic Gonadotropin*), fatores de crescimento (IGF, TGF, EGF e FGF), progesterona, líquido folicular, e antioxidantes (BUKOWSKA et al., 2012;MINGOTI et al., 2009).

Em virtude da importante ação da glutathiona (GSH) contra o estresse oxidativo, tem sido proposto à suplementação com substratos ou precursores desta molécula, como a cisteamina e o β - mercaptoetanol (ANAND et al., 2008;OYAMADA; FUKUI, 2004). Foi observado o aumento da síntese de GSH e melhores índices de MIV e FIV na espécie bovina após a suplementação com cisteamina ou β -mercaptoetanol (DE MATOS; FURNUS, 2000).

As macromoléculas BSA e SFB aumentam a maturação e o desenvolvimento embrionário, agindo como quelantes de íons, estabilizantes de pH, surfactantes e sequestradores de EROs (STEIN, 2007). Entretanto, por serem de origem animal e apresentarem risco de transmissão de patógenos e alterações entre produtores e lotes, há variabilidade nos sistemas de cultivo e nos resultados obtidos (MINGOTI et al., 2009). Como alternativa, aditivos sintéticos, como o álcool polivinílico (PVA) e a polivinil pirrolidona (PVP), estão sendo empregados em substituição aos convencionalmente utilizados, porém muitos estudos indicam a produção de menores taxas de blastocistos viáveis (SORIA, 2005).

Em relação às gonadotropinas, seus efeitos são resultantes de suas ações fisiológicas na comunicação oócito-CC e na maturação oocitária (CHA; CHIAN, 1998;CHIAN et al., 2002;DE et al., 1999). Já os hormônios de crescimento aceleram a maturação nuclear e aumentam a expansão das CC, a taxa de blastocistos e

embriões devido à melhor distribuição dos GC (IZADYAR et al., 1998). A progesterona possui participação na capacitação oocitária aumentando a competência dos oócitos em primatas (ZHENG et al., 2003), com ação direta nos oócitos ou nas CC circundantes (LARSON; KRISHER; LAMB, 2011).

A adição em meio MIV de fluido folicular bovino (FFb), também demonstra atuação no processo de crescimento oocitário. Foi observado que 5% (v/v) de FFb reforçou a translocação mitocondrial, níveis intracelulares de ATP e a expansão das CC. Além disso, foi visto uma maior proteção ao estresse oxidativo gerado pela possível presença de melatonina, que junto a outras moléculas antioxidantes como mercaptoetanol, cisteína, vitaminas A, C e E ou cátions quelantes divalentes, como o EDTA, taurina, hipotaurina e transferrina, surge como uma alternativa de suplementação em vários estudos (SOMFAI et al., 2012). A capacidade de preservação da viabilidade celular durante a manipulação *in vitro*, protegendo a célula do mecanismo de estresse oxidativo, torna essas moléculas valorizadas funcionalmente (EL-RAEY et al., 2011).

Adicionalmente a essas suplementações, outros compostos e abordagens surgem para tentar suprir as necessidades nutricionais e fisiológicas dos oócitos. A utilização de substâncias que retêm o processo de meiose como a roscovitina e butirolactona-I, o controle das condições de pH, temperatura, osmolaridade do meio e tensão de O₂, também estão sendo estudados na tentativa de melhorar e aumentar o sucesso da MIV (GILCHRIST; THOMPSON, 2007).

2.4. Tretinoína

A TTN, um retinóide natural, é metabólito ativo da vitamina A (OURIQUE et al., 2008; SOPRANO; QIN; SOPRANO, 2004) e desempenha sua função através da interação ligante-receptor, auxiliando no estabelecimento do plano corporal durante as fases iniciais do desenvolvimento, na visão, na proliferação e diferenciação celular, na função imunológica e neuronal (TANG; GUDAS, 2011). Os isômeros AR *all-trans* e 9-*cis* se ligam à receptores AR (RAR; α , β e γ) e AR X (RXR; α , β e γ)

respectivamente, porém, sob condições *in vitro*, AR 9-*cis* pode ativar ambos, RXR e RAR. Quando ativados, os receptores nucleares RAR-RXR formam heterodímeros, que são capazes de se ligarem à sequências de DNA específicas, chamadas de elementos responsivos ao ácido retinóico (RAREs), as quais estão presentes nas regiões promotoras de seus genes alvos, controlando a expressão gênica. Além disso, os RXRs podem formar homodímeros e outros heterodímeros com o receptor da vitamina D, do hormônio tireodiano e com o receptor ativado *por* proliferador peroxissomal (CHAMBON, 1996; MANGELSDORF; EVANS, 1995), assim podendo explicar os efeitos pleiotrópicos dos retinóides.

A presença de subtipos RAR α , RAR γ , RXR α , RXR β em oócitos, em blastocistos eclodidos e CCs (MOHAN et al., 2001; MOHAN et al., 2002), sugerem que os ARs podem estimular desenvolvimento inicial embrionário (DEB et al., 2011) e a competência oocitária (HIDALGO et al., 2003). Os retinóides podem melhorar a qualidade e o processamento de mRNA durante a maturação através do aumento da poliadenilação (GOMEZ et al., 2004), e agir na expressão dos receptores de FSH e LH, como demonstrado nas células da granulosa de murinos (MINEGISHI et al., 2000) e suínos (HATTORI et al., 2000). Além disso, também exercem proteção contra os danos oxidativos, mantendo os níveis adequados de compostos e enzimas antioxidantes (GUERIN; EL; MENEZO, 2001) e induzem maior expressão de midkine (MK), fator de crescimento ligante de heparina, que parece aumentar a capacidade de desenvolvimento de embriões e oócitos (IKEDA et al., 2000). Duque e colaboradores (2002) demonstraram que a suplementação com AR 9-*cis*, na presença de roscovitina, melhorou a maturação citoplasmática; Barekati e colaboradores (2008) observaram o aumento das taxas de maturação e competência em oócitos imaturos desnudos de camundongos (NASIRI et al., 2011; TAHAEI et al., 2011) e maiores obtenção de blastocistos bovinos (GOMEZ et al., 2003; RODRIGUEZ et al., 2006).

Os efeitos benéficos que os ARs exercem sobre a MIV são evidentes, no entanto, há poucos dados referentes à ação da TTN nas CC e no oócito bovino, o qual é amplamente utilizado em estudos que servem como base para o entendimento das necessidades e do comportamento deste gameta em outras espécies, como a humana.

2.5. Nanotecnologia

Uma abordagem altamente promissora que vem aumentando o interesse de pesquisadores da área de biologia reprodutiva é a realização da entrega de moléculas mediada por nanocarreadores. A estrutura especializada e o papel funcional dos gametas e tecidos reprodutivos requerem o uso de ferramentas de pesquisas que sejam minimamente invasivas e que não interfiram na fertilidade ou afetem o desenvolvimento dos embriões (BARKALINA et al., 2013).

A nanotecnologia pode melhorar a segurança biológica e a eficácia de muitas metodologias experimentais existentes (ARVIZO et al., 2012; LAMMERS et al., 2011). A versatilidade das nanopartículas facilita grandemente a sua utilização como sistemas de distribuição para a maioria dos tipos de compostos biológicos, incluindo pequenas moléculas, peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos (BARKALINA et al., 2013).

Os nanomateriais utilizados na medicina reprodutiva devem ser incapazes de causarem toxicidade aguda e de induzir efeitos transgeracionais a longo prazo. Além disso, não devem afetar a viabilidade e a funcionalidade de gametas e/ou embriões, a integridade do DNA, os perfis de expressão gênica, a síntese de proteínas, a produção de energia, a divisão celular, a indução de apoptose, a liberação de espécies reativas de oxigênio, ou promover mecanismos alternativos de colapso celular (BARKALINA et al., 2013). A análise de nanotoxicidade representa um desafio, pelo fato de que os mecanismos que governam a interação dos nanomateriais com as células e os seus efeitos finais, dependem de uma combinação de fatores incluindo propriedades físicas e químicas do nanocarreador (tamanho, superfície, carga, revestimento, presença de grupos funcionais) e características morfológicas e fisiológicas das células alvo (BARKALINA et al., 2013). Até o presente momento, apenas estudos relacionados à biocompatibilidade de nanomaterias com espermatozoides tem sido reportados utilizando-se nanopartículas magnéticas de ferro (KIM et al., 2010; MAKHLUF et al., 2006), pontos quânticos com núcleo de seleneto de cádmio e coroa de sulfeto de zinco

(FEUGANG *et al.*, 2012), nanotubos de haloisita e nanopolímeros comerciais (CAMPOS *et al.*, 2011).

Com relação aos efeitos das nanopartículas sobre o desenvolvimento embrionário inicial, publicações sustentam a biocompatibilidade do quitosano (EMA *et al.*, 2010;SUWANSA-ARD *et al.*, 2009) e nanopartículas de poliestireno (YANG *et al.*, 2011).

Muito utilizada para tratamentos de doenças de pele e no tratamento anti-tumoral, pesquisadores vêm buscando associar TTN à nanopartículas poliméricas para melhorar a sua solubilidade, estabilidade química, biodisponibilidade e/ ou eficácia. Darmanin *et al.* (2007) sugeriram que o AR pode melhorar a migração de células dendríticas do tumor para os gânglios linfáticos de drenagem, aumentando a imunidade anti-tumoral, porém a solubilidade em água e a estabilidade baixas do AR são as principais desvantagens das suas formulações. O uso clínico de AR foi associada com uma rápida diminuição da sua concentração sérica após a contínua administração oral ou injeção intravenosa (ACHKAR *et al.*, 1994). No entanto, a nanoencapsulação de AR pode ultrapassar estas limitações e, portanto, oferece maiores vantagens. Ourique *et al.* (2008) mostraram que a utilização de nanocápsulas reforça duas vezes mais a fotoestabilidade do AR em relação a solução metanólica.

O nanoencapsulamento de AR demonstra um perfil de liberação prolongada e uma maior estabilidade (ALMOUAZEN *et al.*, 2012), oferecendo uma nova estratégia no tratamento anti-tumoral e de doenças de pele, e para os estudos relacionados ao desenvolvimento embrionário, possibilitando o surgimento da nanoembriologia.

3. OBJETIVOS

Geral:

O presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos da suplementação com tretinoína associada à nanocápsulas de núcleo lipídico (TTN-LNC) quando adicionada na maturação *in vitro* de CCOs bovinos.

Específicos:

- 1 – Testar concentrações diferentes de tretinoína livre (TTN) e TTN-LNC suplementadas no meio de MIV;
- 2 – Testar a suspensão de nanocápsulas (LNC), para averiguar se há interferência de sua ação na função do composto;
- 3 – Avaliar os efeitos de uma formulação já caracterizada de TTN-LNC na taxa de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto;
- 4 – Avaliar a expressão dos genes relacionados à apoptose (*BAX*, *MCL-1*, *CASPASE-3* e *SHC1*) e à pluripotência (*NANOG*, *SOX2* e *OCT4*);
- 5 – Verificar a formação de EROs em embriões produzidos *in vitro* de 2 a 4 células;

4. ARTIGO

O presente artigo foi formatado com as normas do periódico

Reproductive Toxicology

- Effects of tretinoin-loaded polymeric nanocapsules in *in vitro*-produced bovine blastocysts**

Abstract

The improvement of *in vitro* maturation (IVM) protocols through supplementation with different molecules improves the efficiency of the culture media. Tretinoin is considered one of the most important retinoids in vertebrate embryogenesis and its association with lipid-core nanocapsules (TTN-LNC) is an alternative to improve solubility and chemical stability. We evaluated the effects of supplementation with TTN-LNC in IVM medium, through the analysis of rates of embryonic development, production of reactive oxygen species (ROS) and expression of genes related to apoptosis and pluripotency. The lowest dose of TTN-LNC (0.25 μ M) generated higher blastocyst production and reduced ROS production. Even, lower expression of *BAX* and *SHC1* was observed in TTN and TTN-LNC group, suggests beneficial effects on the development of embryos. Our results suggest that nanoencapsulation allows the use of smaller doses, thus reducing the interference supplementation in IVM media and improve the blastocyst rates.

Keywords: bovine oocytes; *in vitro* maturation (IVM); tretinoin; nanocapsules; supplementation.

1.Introduction

The development of studies of *in vitro* production (IVP) of bovine embryos, have been promoting an improvement in genetic pattern and animal production. Therefore, despite many reports about successful *in vitro* maturation and *in vitro* development of mammalian immature oocytes, the proportion of embryos reaching the blastocyst stage is rarely higher than 40% with compromised embryo quality and competence (1-4).

Improving the protocols of *in vitro* maturation (IVM) through supplementation with different molecules has become an alternative to increase the efficiency of the culture medium and allow that immature oocytes acquire competence for fertilization and embryogenesis (5-7). Supplementation with retinoic acid (*all-trans* RA and 9-*cis* RA) has demonstrated beneficial effects for a number of reproductive processes (8-12). The presence of nuclear retinoic acid receptors (RAR) and retinoid X receptors (RXR), in the oocyte until hatched blastocyst stages and in cumulus cells have been indicated important roles of RA during early embryonic development (13-15).

Tretinoin (TTN, *all-trans* retinoic acid, ATRA), an active metabolite product of vitamin A, is considered one of the most important retinoid in cell proliferation, differentiation and embryonic development under *in vivo* as well *in vitro* conditions (16). Recently, TTN has been shown to increase maturation of immature oocytes *in vitro* and improve the development of resultant mice and bovine embryos (17;18). Also used for treatment of skin disorders and in anti-tumor treatment, studies have been conducted to associate TTN, a poorly water soluble drug, with polymeric nanoparticles to protect them from degradation and improve its chemical stability, aqueous solubility and efficacy (19-21).

Drug delivery systems have received considerable attention for applications in biology and medicine (22). Polymeric nanoparticles have been extensively studied as drug carriers, providing a therapeutic agent of interest embedded or encapsulated within a polymer matrix, adsorbed or conjugated on its surface (23). They are used to modify the release profile and the distribution of active compounds, allowing more efficient molecule delivery or site-specific molecule delivery, especially those that act through cytoplasmic receptors (24) reducing toxic effects (25). Recently, a new particle it was proposed, called as lipid-core nanocapsules, as efficient drug nanocarriers. Whereas conventional nanocapsules present an oil core, lipid-core nanocapsules present a core composed of a liquid lipid dispersion capric/caprylic (26). In order to investigate the action of tretinoin- loaded lipid-core nanocapsules (TTN-LNC) in embryonic development, this molecule have been tested on *in vitro* maturation with the aim of analyze the effects in embryo development, production of reactive oxygen species (ROS) and in transcriptional level of genes related with apoptosis and maintenance of pluripotency.

2.Materials and methods

2.1 Nanocarrier preparation

TTN-LNC were prepared as previously reported (26) by interfacial deposition of polymer, using poly(ϵ -caprolactone) at 1% (w/v) as biodegradable polymer. Briefly, 250 mg of polymer, 0.77% (w/v) of sorbitan monostearate, 3.3% (v/v) of capric/caprylic triglyceride mixture and 0.05% (w/v) of tretinoin were dissolved in 67

mL of acetone. This organic solution was poured in to 134 mL of an aqueous phase containing 0.77% (w/v) of polysorbate 80 under magnetic stirring during 10 minutes. Acetone was then eliminated and the aqueous phase concentrated by evaporation at 40°C under reduced pressure to a final volume of 25 mL. The concentration of tretinoin was set to 0.5 mg.mL⁻¹. In order to verify the action of polymeric layer, blank lipid-core nanocapsules (LNC) were prepared in a similar way, but without the addition of the drug into organic phase. All formulations were stored protected from light during all the time.

2.2 Nanocarrier characterization

Nanocarrier characterization was previously performed for three independent batches (26). For this study we confirm the following characteristics: particle size, polydispersity index, zeta potential and drug content. The particle size and polydispersity index (PDI) were measured using photon correlation spectroscopy (PCS) (Zetasizer[®] Nanoseries ZEN3600, Malvern Instruments, Worcestershire, England) using nanoparticle suspension diluted (1:500, v/v) in filtered water (0.45 µm, Millipore, Bedford, USA). Zeta potential (ζ-potential) were measurements using the same instrument at 25 °C according to the electrophoretic mobility principle, after the dilution (1:500, v/v) of the samples in a filtered (0.45 µm, Millipore, Bedford, USA) 10 mM NaCl aqueous solution. The drug content was assayed by high performance liquid chromatography (HPLC) after dissolution of nanocapsules in acetonitrile.

2.3 Experimental design

The concentration-dependent effect of TTN-LNC and TTN added in oocyte maturation were tested. Selection of concentration was based on preliminary results and previous reports (9;27-30). The experimental groups were established and for groups TTN-LNC and TTN the cumulus-oocyte complexes (COCs) were matured in oocyte *in vitro* maturation medium supplemented with 0.25, 0.5 and 1 μ M of TTN-LNC or TTN. Control group of COCs matured without treatment and a control treated with 1 μ M of LNC were also examined. The suspensions of TTN-LNC and LNC were routinely prepared. The TTN was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and aliquoted at a final concentration of 50 μ M. *In vitro* fertilization assay was conducted to verify the effects of treatments on embryo development, ROS production and gene expression.

2.4 Oocyte collection and *in vitro* maturation (IVM)

Bovine ovaries were collected from a local abattoir and transported to the laboratory with temperature controlled. A total of 870 COCs were aspirated from follicles (2–8 mm in diameter) with a sterile 18-gauge needle attached to a disposable syringe. Only COCs with a homogeneous cytoplasm and with at least three layers of surrounding cumulus cells were selected for IVM. Prior to IVM, COCs were washed three times in TCM-199 HEPES (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% FCS and 50 g gentamycin sulfate, and were washed once in bicarbonate TCM-199 (Gibco Life Technologies) supplemented with 10% FCS, 5 μ g LH (Ayerst, Rouses Point, NY, USA), 0.5 μ g FSH (Folltropin,

Vetrepharm, Belleville, ON, Canada), 1 µg estradiol (estradiol-17β, Sigma E-8875), 2.2 µg pyruvate (Sigma P-4562), and 50 µg gentamycin/mL of medium. Group of 20 COCs were placed into 100 µl drops of *in vitro* maturation medium, with treatment applied according to the experimental design, covered with mineral oil and *in vitro* matured for 24 h at 38.5 °C, 5% CO₂ in air with maximum humidity.

2.5 *In vitro* fertilization (IVF) and Culture

To IVF, COCs were washed twice times in pre-fertilization medium of TCM-199 supplemented with 25 mM HEPES (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) and 0.3% BSA (Sigma A-9647), and were washed once in TALP fertilization medium, supplemented with heparin and penicillamine, hypotaurine, and epinephrine (PHE) solution (31;32). Groups of at least 25 matured COCs were transferred for each 100 µL IVF droplet under mineral oil at 38.5 °C, 5% CO₂ in air with maximum humidity. Straws of frozen bovine semen were thawed in a water bath at 35 °C for 30 s and the semen were washed two times by centrifugation for 5 min at 700 × g in pre-fertilization and TALP fertilization medium, respectively. Final concentration of sperm in fertilization droplets was adjusted to 10⁶ cells/droplet. Twenty hours after IVF, presumptive zygotes were denuded from cumulus cells by repeated pipetting and were transferred to 100 µL droplets of culture medium of embryos, a modified oviduct synthetic fluid (SOFaa BSA, containing 8 mg/mL BSA [free of fatty acid] and 1 mM glutamine) and cultured for 7 d at a temperature of 38.5 °C in an atmosphere of 5% CO₂ in air with maximum humidity. The cleavage rate was evaluated after 72 h of fertilization (Day 3), and 50 µL of medium was renewed with 50 µL of fresh medium. After 120 h of fertilization (Day 5), 50 µL of medium was

again replaced, with the addition of 1 µg/mL glucose. The rate of blastocyst, based on the total number of presumed zygote was recorded at day 7.

2.6 Measurement of ROS production

In order to evaluate the ROS production, two-to-four cell stage embryos were staining with fluorescent probe 2',7' dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCHFDA) as previously described by (33) with some modifications. Briefly, embryos were incubated with DCFA dye (Sigma #4091-99-0) in phosphate buffered saline (PBS- Nutricell, Campinas, SP, Brazil) for 30 min in a dark chamber at 38.5 °C. After staining, all samples were washed three times in PBS to remove the traces of the dye and mounted on glass slides covered with cover slips for fluorescence microscopic evaluation. At 480 nm of excitation and 510 nm of emission filter, images were acquired using a digital camera (Nikon, Tokyo, Japan) attached to a fluorescence microscope (DP 12; BX 51; Olympus, Tokyo, Japan). The photographs were analyzed using Cell^F software (Olympus, New York, USA), measuring the pixels intensity. The experiment was replicated three times with 15–20 embryos in each replicate.

2.7 Gene expression Analysis

For each group, total RNA was isolated from pools of seven embryos in blastocyst stage using TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA). The RNA extracted was quantified using the NanoVue spectrophotometer (General Eletrics Healthcare Limited, UK) and first-strand cDNA synthesis was performed using High

Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). All steps described were performed according to the manufacturer's instructions. Real-Time PCR reactions were performed on a Stratagene Mx3005P Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, UK) and the primer sequences described in Table 1 to amplify four genes related with apoptosis: caspase-3 (*CASP-3*), Bcl-2-associated X protein (*BAX*), Myeloid cell leukemia-1 (*MCL-1*) and (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1 (*SHC1 SHC*, also known as *P66*); and three genes related to pluripotency: RY-related HMG-box containing factor (*SOX2*), octamer-binding protein 4 (*OCT4*, also know *POUF51*), *NANOG*. The β -actin gene (9;34) was used in parallel with genes of interest as an endogenous control for PCR reaction efficiency. A negative control reaction, lacking template cDNA, was run in parallel as a control against the formation of primer–dimers. The real-time PCR data were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, according to Pfaffl (2001) (35).

Table 1. Oligonucleotide primer sequences

Gene	Sequence (forward, reverse)	Anneling temp (°C)
<i>MCL-1</i>	TGTGGCCAAACACTTGAAGAGT CCTTACGAGAACATCTGTGATGCTT	60
<i>SHC-1</i>	AAGTCAACGGGGACTTCCTT GGCAAGTGATTGTCCATGTG	60
<i>OCT4</i>	GGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTC ACACTCGGACCACGTCTTTC	55
<i>SOX2</i>	CGAGTGGAAACTTTTGTCCG GGTATTTATAATCCGGGTGTT	55
<i>BAX</i>	CTACTTGCCAGCAAACCTGG TCCCAAAGTAGGAGAGGA	56
<i>NANOG</i>	TTCCCTCCTCCATGGATCTG ATTTGCTGGAGACTGAGGTA	58
<i>CASPASE- 3</i>	GGACCCGTCAATTTGAAAAA CATGTCATCCTCAGCACCAC	55
β -actin	CTAGGCACCAGGGCGTCATG CTTAGGGTTTCAGGGGGGGCCT	60

2.8 Data Analysis

Data sets were analyzed using a factorial ANOVA followed by a Tukey test for multiple comparisons. Three treatments were considered: TTN, LNC and TTN-LNC. Significance was considered at P value < 0.05 in all analyses. Chi-square analysis was performed to compare cleavage, blastocyst formation and hatching/hatched rates. All data were expressed as mean $\pm$ SEM.

3. Results

3.1 Production and characterization of lipid-core nanocapsules

Formulations of TTN-LNC were previously described (26). Each preparation used in the present study was evaluated for its drug content, showing values between 0.45 and 0.55 mg/mL, in accordance with the theoretical value (0.5 mg/mL). Mean particle sizes were below 250 nm (225 ± 2 nm and 208 ± 2 nm for TTN-LNC and LNC, respectively). Low polydispersity indices (0.08 ± 0.01 and 0.15 ± 0.01 for TTN-LNC and LNC) showed an adequate homogeneity of the particle sizes. Zeta potentials were negative, regardless of the presence of the drug (-12.7 ± 0.9 mV and -11.0 ± 0.6 mV for TTN-LNC and LNC. Encapsulation efficiency of tretinoin in lipid-core nanocapsules was previously reported as higher than 99.9% (26).).

3.2 Embryo development

As shown in Table 2, the presence of TTN-LNC in IVM showed improved cleavage, blastocyst and hatching rates comparable to those embryos derived from oocytes matured in the presence of TTN and in controls. The supplementation with 0.25 μ M of TTN-LNC improved ($p < 0.05$) blastocyst formation. Moreover, cleavage and hatched rates were positively affected by the addition of 1 μ M TTN-LNC. In all treatments, embryos that reached to the blastocyst stage maintained normal morphological aspects. The pellucid zone were intact and their thickness was

251 appropriate for expanded embryos, inner cell masses were well identifiable at one
252 pole and blastomeres and trophoblastic cells appeared normal.

Table 2. *In vitro* embryo development of bovine oocytes *in vitro* matured with different concentration of free tretinoin (TTN) and tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules (TTN-LNC).

Treatment	Oocyte	Presumed zygote	Cleaved (%) [#]	Blastocysts (%) [#]	Hatched blastocysts (%) [#]
Control	125	96	59 (61,5) ^a	26 (27,1) ^a	12 (46,2) ^b
LNC	64	57	45 (78,9) ^b	15 (26,3) ^a	6 (40,0) ^b
TTN-LNC 0,25µM	92	79	68 (86,1) ^b	37 (46,8) ^b	20 (54,1) ^b
TTN-LNC 0,5µM	79	73	57 (78,1) ^b	21 (28,8) ^a	11 (52,4) ^b
TTN-LNC 1,0µM	72	67	61 (91,0) ^c	26 (38,8) ^a	17 (65,4) ^c
TTN 0,25µM	78	70	58 (82,9) ^b	23 (32,9) ^a	8 (34,8) ^b
TTN 0,5µM	95	90	69 (76,7) ^b	25 (27,8) ^a	5 (20,0) ^a
TTN 1,0µM	76	65	48 (73,8) ^b	20 (30,8) ^a	8 (40,0) ^b

^{a-c} Within a column, rates without a common superscript differed ($P < 0.05$). [#] Rates of cleavage, blastocyst formation and hatched blastocysts are expressed as a percentage of the initial number of oocytes. LNC: blank lipid-core nanocapsules; TTN-LNC: tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules; TTN: tretinoin.

3.3 ROS production

The effect of TTN and TTN-LNC on ROS generation in embryos is shown in Fig 1. A significant decrease ($p < 0.05$) in ROS production was detected in presence of TTN-LNC compared with the controls. In TTN and TTN-LNC group, there no was difference between the concentrations. Compared with the control group, ROS levels were lower in embryos derived from oocytes matured in the presence of TTN or TTN-LNC. Both TTN-LNC as TTN protect the cell more effectively against oxidative damage reducing ROS production.

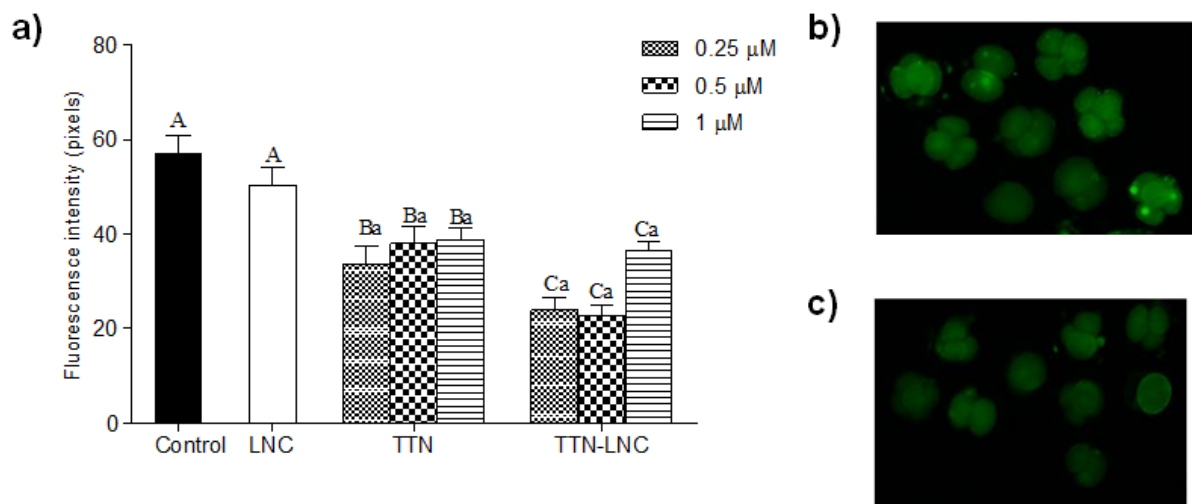


Figure 1. Reactive oxygen species levels (ROS) in *in vitro*-produced bovine 2-4cell stage embryos. a) Evaluation of fluorescence intensity in bovine embryos produced in *in vitro* maturation media supplemented with free tretinoin (TTN) and tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules (TTN-LNC). b) e c) fluorescent photomicrographs of 2-4 cell stage embryos with DCHFDA correspond respectively to control, and 0,25 μM of TTN-LNC. ^{A,B,C} Treatments without a common superscript differ ($P < 0.05$). ^a Within concentration of 0,25, 0,5 and 1 μM with a common superscript no differ ($P < 0.05$).

3.4 Gene expression

An evaluation of gene expression profile was performed to assess which pathway was involved in TTN-LNC action. The mRNA expression profiles are shown in Fig. 2, for apoptosis-related genes; Fig. 3 for pluripotency-related genes. The expression level of 5 out of 7 genes analyzed (*BAX*, *MCL-1*, *CASP-3*, *SHC1*, *SOX2*, *NANOG*, *OCT4*) did not differ among the treatments. Only, *BAX* and *SHC1* abundance was decreased ($p < 0.05$) in presence of TTN or TTN-LNC.

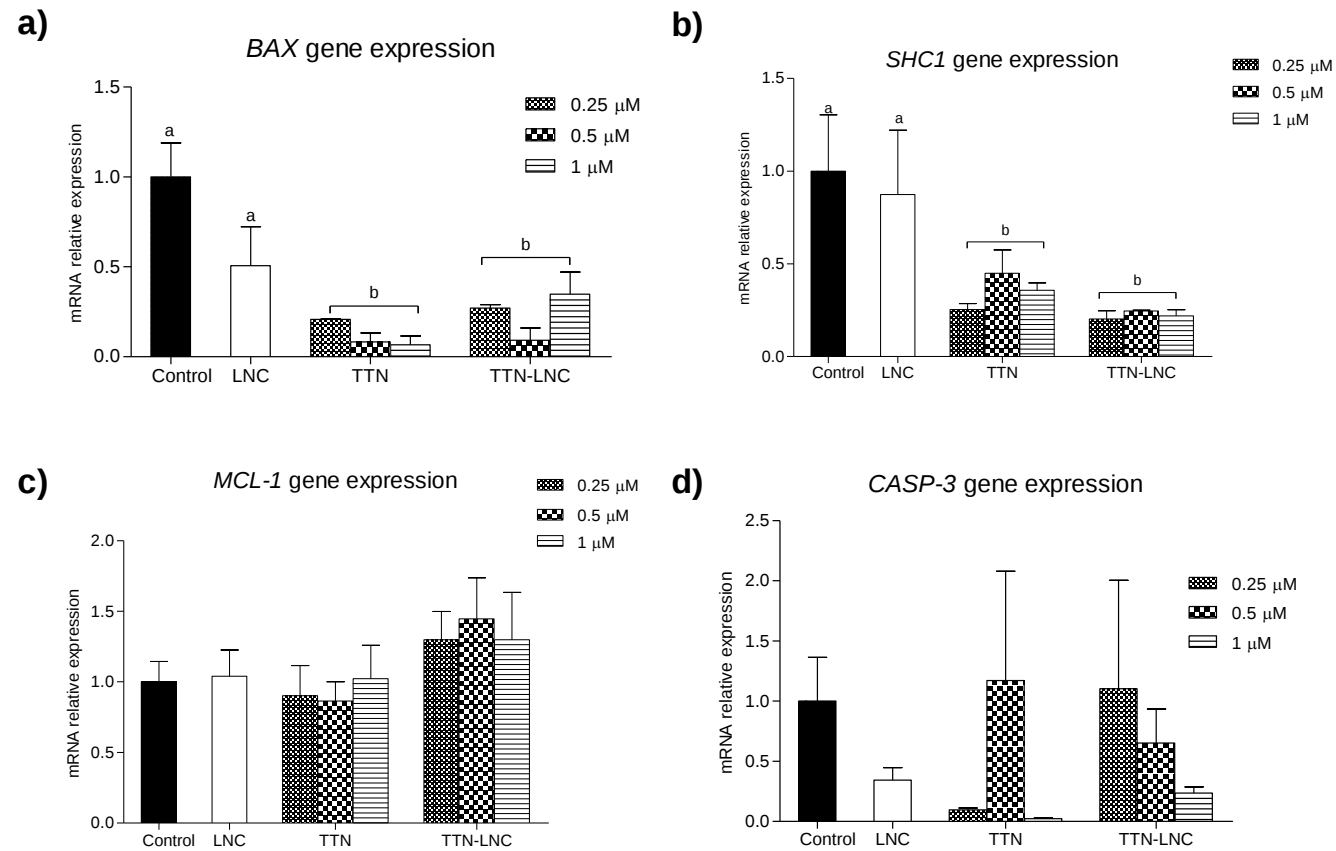


Figure 2. Relative abundance transcripts of apoptosis-related genes *BAX*, *SHC1*, *MCL-1* and *CASP-3* (a, b, c and d respectively) in bovine blastocysts produced in *in vitro* maturation media supplemented with free tretinoin (TTN) and tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules (TTN-LNC). ^{a,b} Difference among groups ($P < 0.05$). There were no differences ($P < 0.05$) among concentrations.

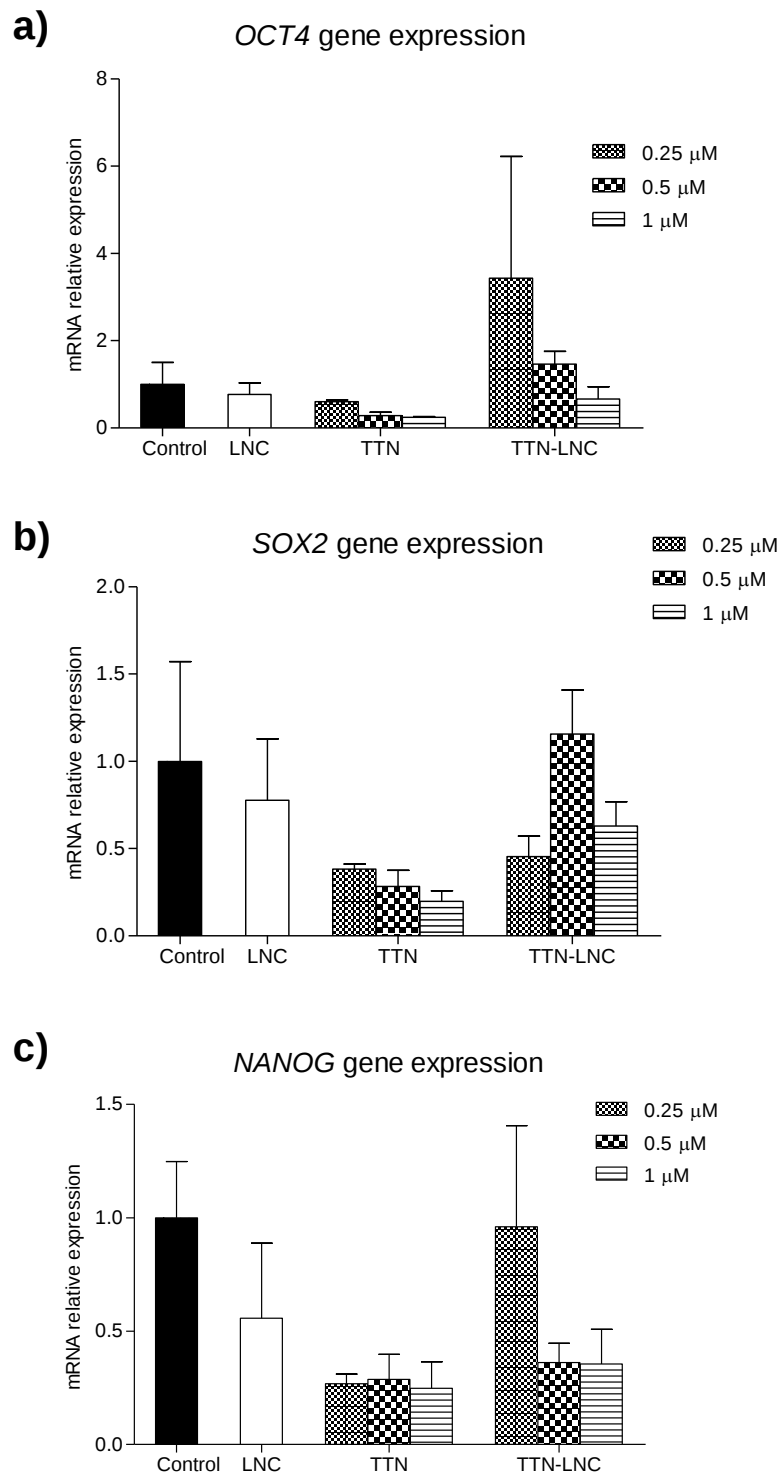


Figure 3. Relative abundance transcripts of pluripotency-related genes *OCT4*, *SOX2* and *NANOG* (a,b and c respectively) in bovine blastocysts produced in *in vitro* maturation media supplemented with free tretinoin (TTN) and tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules (TTN-LNC).

4. Discussion

The present study elucidated by the first time the effects of tretinoin-loaded lipid core nanocapsules (TTN-LNC) formulation on bovine embryo development, ROS production and in the transcriptional level of genes related with apoptosis [*BAX*, *MCL-1*, *CASPASE-3* (36) and *SHC1* (37)] and pluripotency [*SOX2*, *OCT4* and *NANOG* (38)].

The lowest concentration (0,25 μ M) of TTN-LNC demonstrated significant improved blastocyst rates comparable to those embryos derived from oocytes matured in the presence of TTN and in controls. Moreover, the presence of TTN-LNC in IVM showed improved cleavage, blastocyst and hatching rates. The roles of retinoic acid in improvement of developmental competence of oocytes and embryo viability have been related (9-12;39). Improved blastocyst development was obtained with TTN 1 μ M (10;30). The effects of 0.25 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M and 10 μ M of TTN on oocytes mouse maturation have been previously investigated. Mouse oocytes which exposed to 2 μ M concentrations of TTN have shown subsequent blastocyst development (40). Taking into consideration the importance of an accurate and reduced dose, we demonstrated that the nanoencapsulation increases the efficacy of active molecules because its biodistribution follows that of the carrier, rather than depending on its own physicochemical properties.

Previously study suggest that retinoids can act directly on the oocyte or adjacent cumulus cells or through both paracrine and autocrine manner (11). RA induces the cortical granule migration before maturation blocking polyspermy and improving oocyte developmental competence (18). Similarly, it has been suggested

that retinoic acid may improve mRNA quality and processing through polyadenylation (41), and increase the expression of midkine mRNA (42). Midkine, a member of the heparin-binding growth/differentiation family, can suppress apoptosis in cumulus cells during IVM of bovine COCs with beneficial effects on oocyte cytoplasmic maturation (10).

In addition, we observed significant decrease in ROS production in the presence of TTN-LNC, compared with the TTN and controls. Both TTN-LNC as TTN protect the cell more effectively against oxidative damage reducing ROS production. A number of studies (43-46) have shown that retinoids may promote development through participation on antioxidant defense mechanism and have been implicated as important regulators of redox signaling pathways (17;44;46-48).

A high-level oxygen tension during *in vitro* embryo production induces an oxidative stress by generating hydrogen peroxide, single oxygen, superoxide anion and peroxy hydroxyl, and alkoxyl radicals (2), which are highly harmful for oocyte and embryo development (43;49). Retinol derivatives can quench oxygen molecules and maintain adequate levels of antioxidant compounds and enzymes (43). TTN inhibits the glutathione depletion induced by staurosporine in neuronal cell, sustained adequate levels of this compost that has been described as being essential for *in vitro* embryo production preventing oxidative damage (50).

The expression of genes related with apoptosis (*BAX*, *CASPASE-3*, *MCL-1* and *SHC1*) and maintenance of pluripotency (*SOX2*, *OCT4* and *NANOG*) were compared among the groups. The analysis of relative mRNA abundance showed no significant difference in the expression of 5 genes. Only for *BAX* and *SHC1* a difference between the groups was observed. Treatment of oocytes with TTN-LNC and TTN downregulates *SHC1* and *BAX* expression. The *SHC1* gene is involved in

the induction of the apoptosis by altering the *BAX* gene expression pattern (51). The mRNA and protein levels of *SHC1* were significantly elevated in 2–4 cell bovine embryos with arrested development as compared to in embryos with normal development (52). In addition, elevated levels of *SHC1* were found to be associated with oxidative damage and the production of ROS (53). *BAX* is a pro-apoptotic BCL-2 family member that promotes cell death releasing cytochrome c from mitochondria. The higher transcriptional levels of *BAX* gene were correlated with an attenuated rate of development (54) and morphologically poor quality as compared with good quality embryos in the same developmental stage (36;54;55). The effect on *BAX* expression also may have been due the induction of midkine, an RA-inducible growth and differentiation factor which is associated with the occurrence of beneficial effects on cytoplasmic maturation and suppression of COCs apoptosis (10).

Our results demonstrated that nanoencapsulation of tretinoin probably improved its biodisponibility and intracellular drug delivery, thereby increasing the rate of blastocyst production, reducing the production of reactive oxygen species in the presence of a lower dose and downregulating *BAX* and *SHC1* expression.

5. Conclusion

We conclude that the nanoencapsulation allowed that a lowest tretinoin dose may be added to the maturation medium, improving quality and embryo production and reducing ROS production making nanoembriology a potential tool for increasing rates of *in vitro* embryo production.

Acknowledgements

This work was supported by Brazilian funding agencies CAPES, CNPq and FAPERGS. Priscilia Marques Moura de Leon, Eliza Rossi Komninou, Mariana Harter Remião, William Domingues and Cristina Haas assisted with ovaries collection, *in vitro* embryo production and treatment, embryo evaluations and real-time quantitative analysis; Ruy Carlos Ruver Beck, Adriana Raffin Pohlmann and Silvia Stanisçuaski Guterres and Aline Ourique conceived the TTN, LNC and TTN-LNC treatments; Vinicius Farias Campos analyzed data, Andrea Cristina Basso manufactured the media used for in vitro embryo production; Tiago Collares and Fabiana Seixas contributed intellectually and read the final manuscript.

References

- (1) Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA, Tervit HR. Factors Affecting the In vitro Development to Blastocysts of Bovine Oocytes Matured and Fertilized In vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 1991 May;92(1):125-31.
- (2) Dalvit GC, Cetica PD, Pintos LN, Beconi MT. Reactive oxygen species in bovine embryo in vitro production. *Biocell* 2005 Aug;29(2):209-12.
- (3) Lonergan P, Fair T. In vitro-produced bovine embryos - Dealing with the warts. *Theriogenology* 2008 Jan 1;69(1):17-22.
- (4) Liu ZS, Foote RH. Development of Bovine Embryos in Ksom with Added Superoxide-Dismutase and Taurine and with 5-Percent and 20-Percent O-2. *Biology of Reproduction* 1995 Oct;53(4):786-90.
- (5) Harris AD, Moore T. Vitamin-A in Infective Hepatitis. *British Medical Journal* 1947;1(4503):553-8.
- (6) Abe H, Hoshi H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *J Reprod Dev* 2003 Jun;49(3):193-202.
- (7) Lima PF, Oliveira MAL, Goncalves PBD, Montagner MM, Reichenbach HD, Weppert M, et al. Effects of retinol on the in vitro development of *Bos indicus*

- embryos to blastocysts in two different culture systems. *Reproduction in Domestic Animals* 2004 Oct;39(5):356-60.
- (8) Alminana C, Gil MA, Cuello C, Caballero I, Roca J, Vazquez JM, et al. In vitro maturation of porcine oocytes with retinoids improves embryonic development. *Reproduction Fertility and Development* 2008;20(4):483-9.
- (9) Duque P, Diez C, Royo L, Lorenzo PL, Carneiro G, Hidalgo CO, et al. Enhancement of developmental capacity of meiotically inhibited bovine oocytes by retinoic acid. *Human Reproduction* 2002 Oct;17(10):2706-14.
- (10) Gomez E, Royo LJ, Duque P, Carneiro G, Hidalgo C, Goyache F, et al. 9-cis-retinoic acid during in vitro maturation improves development of the bovine oocyte and increases midkine but not IGF-I expression in cumulus-granulosa cells. *Molecular Reproduction and Development* 2003 Nov;66(3):247-55.
- (11) Hidalgo CO, Diez C, Duque F, Facal N, Gomez E. Pregnancies and improved early embryonic development with bovine oocytes matured in vitro with 9-cis-retinoic acid. *Reproduction* 2003 Mar;125(3):409-16.
- (12) Lima PF, Oliveira MAL, Santos MHB, Reichenbach HD, Weppert M, Paula-Lopes FF, et al. Effect of retinoids and growth factor on in vitro bovine embryos produced under chemically defined conditions. *Animal Reproduction Science* 2006 Oct;95(3-4):184-92.
- (13) Mamo S, Ponsuksili S, Wimmers K, Gilles M, Schellander K. Expression of retinoid X receptor transcripts and their significance for developmental competence in in vitro-produced pre-implantation-stage bovine embryos. *Reproduction in Domestic Animals* 2005 Apr;40(2):177-83.
- (14) Mohan M, Malayer JR, Geisert RD, Morgan GL. Expression of retinol-binding protein messenger RNA and retinoic acid receptors in preattachment bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* 2001 Nov;60(3):289-96.
- (15) Mohan M, Malayer JR, Geisert RD, Morgan GL. Expression patterns of retinoid X receptors, retinaldehyde dehydrogenase, and peroxisome proliferator activated receptor gamma in bovine preattachment embryos. *Biology of Reproduction* 2002 Mar;66(3):692-700.
- (16) Chinsriwongkul A, Chareanputtakhun P, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Sila-on W, Ruktanonchai U, et al. Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for Parenteral Delivery of an Anticancer Drug. *Aaps Pharmscitech* 2012 Mar;13(1):150-8.
- (17) Tahaei LS, Eimani H, Yazdi PE, Ebrahimi B, Fathi R. Effects of retinoic acid on maturation of immature mouse oocytes in the presence and absence of a granulosa cell co-culture system. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2011 Jun;28(6):553-8.

- 467 (18) Nasiri E, Mahmoudi R, Bahadori MH, Amiri I. The Effect of Retinoic Acid on In
468 vitro Maturation and Fertilization Rate of Mouse Germinal Vesicle Stage
469 Oocytes. *Cell Journal* 2011;13(1):19-24.
- 470 (19) Brisaert M, Gabriels M, Matthijs V, Plaizier-Vercammen J. Liposomes with
471 tretinoin: a physical and chemical evaluation. *J Pharm Biomed Anal* 2001
472 Dec;26(5-6):909-17.
- 473 (20) Fachinetto JM, Ourique AF, Lubini G, Tedesco SB, Silva ACF, Beck RCR.
474 Tretinoin-loaded Polymeric Nanocapsules: Evaluation of the Potential to
475 Improve the Antiproliferative Activities on *Allium cepa* root-tip Compared to the
476 Free Drug. *Latin American Journal of Pharmacy* 2008 Sep;27(5):668-73.
- 477 (21) Fontana MC, Coradini K, Guterres SS, Pohlmann AR, Beck RCR.
478 Nanoencapsulation as a Way to Control the Release and to Increase the
479 Photostability of Clobetasol Propionate: Influence of the Nanostructured
480 System. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 2009 Jun;5(3):254-63.
- 481 (22) Mahapatro A, Singh DK. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for
482 site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J Nanobiotechnology*
483 2011;9:55.
- 484 (23) Labhasetwar V, Song CX, Levy RJ. Nanoparticle drug delivery system for
485 restenosis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997 Feb 15;24(1):63-85.
- 486 (24) Almouazen E, Bourgeois S, Boussaid A, Valot P, Malleval C, Fessi H, et al.
487 Development of a nanoparticle-based system for the delivery of retinoic acid
488 into macrophages. *International Journal of Pharmaceutics* 2012 Jul 1;430(1-
489 2):207-15.
- 490 (25) Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug
491 delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 2010 Jan 29;385(1-2):113-42.
- 492 (26) Ourique AF, Azoubel S, Ferreira CV, Silva CB, Marchiori MCL, Pohlmann AR,
493 et al. Lipid-Core Nanocapsules as a Nanomedicine for Parenteral
494 Administration of Tretinoin: Development and In Vitro Antitumor Activity on
495 Human Myeloid Leukaemia Cells. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 2010
496 Jun;6(3):214-23.
- 497 (27) Hattori MA, Takesue K, Nishida N, Kato Y, Fujihara N. Inhibitory effect of
498 retinoic acid on the development of immature porcine granulosa cells to
499 mature cells. *Journal of Molecular Endocrinology* 2000 Aug;25(1):53-61.
- 500 (28) Huang FJ, Wu TCJ, Tsai MY. Effect of retinoic acid on implantation and post-
501 implantation development of mouse embryos in vitro. *Human Reproduction*
502 2001 Oct;16(10):2171-6.
- 503 (29) Minegishi T, Karino S, Tano M, Ibuki Y, Miyamoto K. Regulation of midkine
504 messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells. *Biochemical*
505 *and Biophysical Research Communications* 1996 Dec 24;229(3):799-805.

- 506 (30) Rodriguez A, Diez C, Ikeda S, Royo LJ, Caamano JN, Alonso-Montes C, et al.
 507 Retinoids during the in vitro transition from bovine morula to blastocyst.
 508 Human Reproduction 2006 Aug;21(8):2149-57.
- 509 (31) Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone
 510 WH, First NL. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen.
 511 Theriogenology 1986 Apr;25(4):591-600.
- 512 (32) Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm
 513 by heparin. Biol Reprod 1988 Jun;38(5):1171-80.
- 514 (33) Morado SA, Cetica PD, Beconi MT, Dalvit GC. Reactive oxygen species in
 515 bovine oocyte maturation in vitro. Reprod Fertil Dev 2009;21(4):608-14.
- 516 (34) Opiela J, Katska-Ksiazkiewicz L, Lipinski D, Slomski R, Bzowska A, Rynska B.
 517 Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in
 518 immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and
 519 developmental competence following IVP in cattle. Theriogenology 2008 Mar
 520 15;69(5):546-55.
- 521 (35) Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time
 522 RT-PCR. Nucleic Acids Research 2001 May 1;29(9).
- 523 (36) Melka MG, Rings F, Holker M, Tholen E, Havlicek V, Besenfelder U, et al.
 524 Expression of Apoptosis Regulatory Genes and Incidence of Apoptosis in
 525 Different Morphological Quality Groups of In Vitro-produced Bovine Pre-
 526 implantation Embryos. Reproduction in Domestic Animals 2010 Oct;45(5):915-
 527 21.
- 528 (37) Goovaerts IGF, Leroy JLMR, Rizos D, Bermejo-Alvarez P, Gutierrez-Adan A,
 529 Jorssen EPA, et al. Single in vitro bovine embryo production: Coculture with
 530 autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and
 531 gene expression profiles. Theriogenology 2011 Oct 15;76(7):1293-303.
- 532 (38) Pant D, Keefer CL. Expression of Pluripotency-Related Genes during Bovine
 533 Inner Cell Mass Explant Culture. Cloning and Stem Cells 2009 Sep;11(3):355-
 534 65.
- 535 (39) Livingston T, Eberhardt DM, Edwards JL, Godkin JD. Retinol improves bovine
 536 embryonic development in vitro. Reproductive Biology and Endocrinology
 537 2004 Dec 21;2:83-9.
- 538 (40) Eimani H, Efetkhari P, Baharvand H, Tahaei LS, Parivar K, Kasemi Sea. Effect
 539 of retinoic acid on maturation and development of immature mouse oocytes
 540 and resulted embryo from their fertilization in vitro. Yakhteh Medical Journal
 541 2007;9:7-14.
- 542 (41) Gomez E, Rodriguez A, Goyache F, Diez C, Royo LJ, Moreira PN, et al.
 543 Retinoid-dependent mRNA expression and poly-(A) contents in bovine

- 544 oocytes meiotically arrested and/or matured in vitro. *Molecular Reproduction*
545 and Development 2004 Sep;69(1):101-8.
- 546 (42) Royo LJ, Diez C, Goyache F, Duque P, Alvarez I, Hidalgo C, et al. Bovine
547 cumulus-granulosa cells express increased midkine but not IGF-1 in response
548 to 9-*cis* retinoic acid during in vitro maturation [abstract]. *Theriogenology*
549 2003;59:431.
- 550 (43) Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection
551 against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its
552 surroundings. *Human Reproduction Update* 2001 Mar;7(2):175-89.
- 553 (44) Imam A, Hoyos B, Swenson C, Levi E, Chua R, Viriya E, et al. Retinoids as
554 ligands and coactivators of protein kinase C alpha. *Faseb Journal* 2001
555 Jan;15(1):28-30.
- 556 (45) Lonergan P, Gutierrez-Adan A, Rizos D, Pintalo B, De La Fuente J, Boland
557 MP. Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected in vitro
558 or in vivo before and 20 hr after the preovulatory luteinizing hormone surge.
559 *Molecular Reproduction and Development* 2003 Nov;66(3):297-305.
- 560 (46) Olson JA. Vitamin-A and Carotenoids As Antioxidants in A Physiological
561 Context. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 1993;39:S57-S65.
- 562 (47) Ikeda S, Kitagawa M, Imai H, Yamada M. The roles of vitamin A for
563 cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and*
564 *Development* 2005 Feb;51(1):23-35.
- 565 (48) Liang S, Kang J, Jin H, Liu X, Li J, Li S, et al. The influence of 9-*cis*-retinoic
566 acid on nuclear and cytoplasmic maturation and gene expression in canine
567 oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology* 2012 Apr 1;77(6):1198-205.
- 568 (49) Ashok BT, David L, Chen YG, Garikapaty VPS, Chander B, Kanduc D, et al.
569 Peptide mimotopes of oncoproteins as therapeutic agents in breast cancer.
570 *International Journal of Molecular Medicine* 2003 Apr;11(4):465-71.
- 571 (50) Ahlemeyer B, Kriegstein J. Inhibition of glutathione depletion by retinoic acid
572 and tocopherol protects cultured neurons from staurosporine-induced
573 oxidative stress and apoptosis. *Neurochemistry International* 2000
574 Jan;36(1):1-5.
- 575 (51) Leroy JLMR, Van Hoeck V, Clemente M, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Van
576 Soom A, et al. The effect of nutritionally induced hyperlipidaemia on in vitro
577 bovine embryo quality. *Human Reproduction* 2010 Mar;25(3):768-78.
- 578 (52) Favetta LA, St John EJ, King WA, Betts DH. High levels of p66(shc) and
579 intracellular ROS in permanently arrested early embryos. *Free Radical Biology*
580 *and Medicine* 2007 Apr 15;42(8):1201-10.

- 581 (53) Betts DH, Madan P. Permanent embryo arrest: molecular and cellular
582 concepts. *Molecular Human Reproduction* 2008 Aug;14(8):445-53.
- 583 (54) Gutierrez-Adan A, Rizos D, Fair T, Moreira PN, Pintado B, De La Fuente J, et
584 al. Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early
585 bovine embryos cultured in vivo or in vitro. *Molecular Reproduction and*
586 *Development* 2004 Aug;68(4):441-8.
- 587 (55) Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, De La Fuente J, Lonergan P,
588 Gutierrez-Adan A. Consequences of in vitro culture conditions on embryo
589 development and quality. *Reproduction in Domestic Animals* 2008 Oct;43:44-
590 50.

591

592

593

594

595

596

5.CONCLUSÃO

Neste trabalho demonstramos que a adição da menor concentração de nanocápsulas de núcleo lipídico associadas à tretinoína (TTN-LNC) foi capaz de gerar as maiores taxas de produção de blastocisto e reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio. Os resultados sugerem que o nanoencapsulamento, proporcionou uma liberação mais lenta e menor degradabilidade do composto, aumentando a eficiência da suplementação. Estando de acordo com estudos anteriores relacionados aos efeitos dos retinóides na PIV de embriões, nosso trabalho evidenciou um possível potencial dessa nova abordagem, chamada de nanoembriologia, para a suplementação dos meios de MIV e melhora da produção *in vitro* de embriões bovinos.

Referências

- ABADIA, M. E. N. C. **Transferência de embriões em bovinos: revisão de literatura**. 2006. 43 f. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Bovinos) – Pós-Graduação em Produção e Reprodução de Bovinos, Universidade Castelo Branco, Goiânia.
- ABE, H.; HOSHI, H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. **Journal of Reproduction and Development**, v.49, n.3, p.193-202, 2003.
- AHLEMEYER, B.; KRIEGLSTEIN, J. Inhibition of glutathione depletion by retinoic acid and tocopherol protects cultured neurons from staurosporine-induced oxidative stress and apoptosis. **Neurochemistry International**, v.36, n.1, p.1-5, 2000.
- ALBARRACIN, J. L.; MORATO, R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T. Effects of roscovitine on the nuclear and cytoskeletal components of calf oocytes and their subsequent development. **Theriogenology**, v.64, n.8, p.1740-1755, 2005.
- ALI, A.; SIRARD, M. A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, v.66, n.4, p.901-905, 2002.
- 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, n.3-4, p.939-949, 2003.
- ALMINANA, C.; GIL, M. A.; CUELLO, C.; CABALLERO, I.; ROCA, J.; VAZQUEZ, J. M.; GOMEZ, E.; MARTINEZ, E. A. In vitro maturation of porcine oocytes with retinoids improves embryonic development. **Reproduction Fertility and Development**, v.20, n.4, p.483-489, 2008.
- ALMOUAZEN, E.; BOURGEOIS, S.; BOUSSAID, A.; VALOT, P.; MALLEVAL, C.; FESSI, H.; NATAF, S.; BRIANCON, S. Development of a nanoparticle-based system for the delivery of retinoic acid into macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v.430, p.207– 215, 2012.

ANAND, T.; KUMAR, D.; CHAUHAN, M. S.; MANIK, R. S.; PALTA, P. Cysteamine supplementation of in vitro maturation medium, in vitro culture medium or both media promotes in vitro development of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Reproduction Fertility and Development**, v.20, n.2, p.253-257, 2008.

ARVIZO, R. R.; BHATTACHARYYA, S.; KUDGUS, R. A.; GIRI, K.; BHATTACHARYA, R.; MUKHERJEE, P. Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. **Chemical Society Reviews**, v.41, n.7, p.2943-2970, 2012.

ASHOK, B. T.; DAVID, L.; CHEN, Y. G.; GARIKAPATY, V. P. S.; CHANDER, B.; KANDUC, D.; MITTELMAN, A.; TIWARI, R. K. Peptide mimotopes of oncoproteins as therapeutic agents in breast cancer. **International Journal of Molecular Medicine**, v.11, n.4, p.465-471, 2003.

BAREKATI, Z.; GOURABI, H.; VALOJERDI, M. R.; YAZDI, P. E. Previous maternal chemotherapy by cyclophosphamide (Cp) causes numerical chromosome abnormalities in preimplantation mouse embryos. **Reproductive Toxicology**, v.26, n.3-4, p.278-281, 2008.

BARKALINA, N.; KASHIR, J.; JONES, C.; TOWNLEY, H.; COWARD, K. Mesoporous silica nanoparticles as a delivery platform to mammalian gametes: development of novel research tools and techniques for the transfer of therapeutic compounds. **Human Reproduction**, v.28, p.369-370, 2013.

BAVISTER, B. D. Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. **Human Reproduction Update**, v.1, n.2, p.91-148, 1995.

BRISAERT, M.; GABRIELS, M.; MATTHIJS, V.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Liposomes with tretinoin: a physical and chemical evaluation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.26, n.5-6, p.909-917, 2001.

BUKOWSKA, D.; KEMPISTY, B.; PIOTROWSKA, H.; ZAWIERUCHA, P.; BRUSSOW, K. P.; JASKOWSKI, J. M.; NOWICKI, M. The in vitro culture supplements and selected aspects of canine oocytes maturation. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.15, n.1, p.199-205, 2012.

CAMPOS, V. F.; DE LEON, P. M. M.; KOMNINO, E. R.; DELLAGOSTIN, O. A.; DESCHAMPS, J. C.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T. NanoSMGT: Transgene transmission into bovine embryos using halloysite clay nanotubes or nanopolymer to improve transfection efficiency. **Theriogenology**, v.76, n.8, p.1552-1560, 2011.

CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SERAPIÃO, R.V.; RAMOS, A.A.; MACHADO, M.A.; VALE FILHO, V.R.; ANDRADE, V.J. Identificação do sexo de embriões bovinos fecundados *in vitro* e cultivados com células do *cumulus* na presença de soro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.407-409, 2003.

CHA, K. Y.; CHIAN, R. C. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. **Human Reproduction Update.**, v.4, n.2, p.103-120, 1998.

CHAMBON, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. **Faseb journal**, v. 10, p. 940–954, 1996.

CHIAMENTI, A.; AGUIAR, C.; NETO, L. F.; CHAVES, R.; PAULA-LOPES, F.; LIMA, P.; GONCALVES, P.; NETO, C. C. C.; OLIVEIRA, M. Effects of Retinoids on the In Vitro Development of *Capra Hircus*. Embryos to Blastocysts in Two Different Culture Systems. *Reproduction in Domestic Animals* (vol 45, pg e68, 2010). **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, n.6, p.1134, 2010.

CHIAN, R. C.; CHUNG, J. T.; DOWNEY, B. R.; TAN, S. L. Maturation and developmental competence of immature oocytes retrieved from bovine ovaries at different phases of folliculogenesis. **Reproductive Biomedicine Online.**, v.4, n.2, p.127-132, 2002.

CHINSRIWONGKUL, A.; CHAREANPUTTAKHUN, P.; NGAWHIRUNPAT, T.; ROJANARATA, T.; SILA-ON, W.; RUKTANONCHAI, U.; OPANASOPIT, P. Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for Parenteral Delivery of an Anticancer Drug. **Aaps Pharmscitech**, v.13, n.1, p.150-158, 2012.

DALVIT, G. C.; CETICA, P. D.; PINTOS, L. N.; BECONI, M. T. Reactive oxygen species in bovine embryo in vitro production. **Biocell**, v.29, n.2, p.209-212, 2005.

DARMANIN, S.; CHEN, J.; ZHAO, S.; CUI, H.; SHIRKOOHI, R.; KUBO, N.; KUGE, Y.; TAMAKI, N.; NAKAGAWA, K.; HAMADA, J.; MORIUCHI, T.; KOBAYASHI, M. All-trans retinoic acid enhances murine dendritic cell migration to draining lymph nodes via the balance of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Journal of Immunology**, v. 179, p. 4616–4625, 2007

DE, V. A.; VAN, D., V; JORIS, H.; VAN, S. A. In-vitro matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II

oocytes after intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v.14, n.7, p.1859-1863, 1999.

DEB, G. K.; DEY, S. R.; BANG, J. I.; CHO, S. J.; PARK, H. C.; LEE, J. G.; KONG, I. K. 9-cis retinoic acid improves developmental competence and embryo quality during in vitro maturation of bovine oocytes through the inhibition of oocyte tumor necrosis factor-alpha gene expression. **Journal of Animal Science**, v.89, n.9, p.2759-2767, 2011.

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 beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, v.53, n.3, p.761-771, 2000.

DUQUE, P.; DIEZ, C.; ROYO, L.; LORENZO, P. L.; CARNEIRO, G.; HIDALGO, C. O.; FACAL, N.; GOMEZ, E. Enhancement of developmental capacity of meiotically inhibited bovine oocytes by retinoic acid. **Human Reproduction**, v.17, n.10, p.2706-2714, 2002.

EL-RAEY, M.; GESHI, M.; SOMFAI, T.; KANEDA, M.; HIRAKO, M.; ABDEL-GHAFFAR, A. E.; SOSA, G. A.; EL-ROOS, M. E.; NAGAI, T. Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation in vitro in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v.78, n.4, p.250-262, 2011.

EIMANI, H.; EFETKHARI, P.; BAHARVAND, H.; TAHAEI, L. S.; PARIVAR, K.; KASEMI, S. E. A. Effect of retinoic acid on maturation and development of immature mouse oocytes and resulted embryo from their fertilization in vitro. **Yakhteh Medical Journal**, v.9, p.7-14, 2007.

ELAMARAN, G.; SINGH, K. P.; SINGH, M. K.; SINGLA, S. K.; CHAUHAN, M. S.; MANIK, R. S.; PALTA, P. Oxygen Concentration and Cysteamine Supplementation During In vitro Production of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryos Affect mRNA Expression of BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BAX and BID. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, n.6, p.1027-1036, 2012.

EMA, M.; KOBAYASHI, N.; NAYA, M.; HANAI, S.; NAKANISHI, J. Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. **Reproductive Toxicology**, v.30, n.3, p.343-352, 2010.

FACHINETTO, J. M.; OURIQUE, A. F.; LUBINI, G.; TEDESCO, S. B.; SILVA, A. C. F.; BECK, R. C. R. Tretinoin-loaded Polymeric Nanocapsules: Evaluation of the

Potential to Improve the Antiproliferative Activities on *Allium cepa* root-tip Compared to the Free Drug. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.5, p.668-673, 2008.

FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v.71, n.5, p.836-848, 2009.

FEUGANG, J. M.; YOUNGBLOOD, R. C.; GREENE, J. M.; FAHAD, A. S.; MONROE, W. A.; WILLARD, S. T.; RYAN, P. L. Application of quantum dot nanoparticles for potential non-invasive bio-imaging of mammalian spermatozoa. **Journal of Nanobiotechnology**, v.10, 2012.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. Nanoencapsulation as a Way to Control the Release and to Increase the Photostability of Clobetasol Propionate: Influence of the Nanostructured System. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.5, n.3, p.254-263, 2009.

FUKUI, Y. Effects of sera and steroid hormones on development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviduct epithelial cells. **Journal of Animal Science**, v.67, n.5, p.1318-1323, 1989.

FUKUI, Y.; MCGOWAN, L. T.; JAMES, R. W.; PUGH, P. A.; TERVIT, H. R. 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.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, n.2, p.599-616, 2003.

GANDOLFI, F.; BREVINI, T. A. RFD Award Lecture 2009. In vitro maturation of farm animal oocytes: a useful tool for investigating the mechanisms leading to full-term development. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, n.3, p.495-507, 2010.

GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v.67, n.1, p.6-15, 2007.

GOMEZ, E.; RODRIGUEZ, A.; GOYACHE, F.; DIEZ, C.; JOSE, R. L.; MOREIRA, P. N.; NESTOR, C. J.; MORAN, E.; GUTIERREZ-ADAN, A. Retinoid-dependent mRNA expression and poly-(A) contents in bovine oocytes meiotically arrested and/or matured in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.69, n.1, p.101-108, 2004.

GOMEZ, E.; ROYO, L. J.; DUQUE, P.; CARNEIRO, G.; HIDALGO, C.; GOYACHE, F.; LORENZO, P. L.; ALVAREZ, I.; FACAL, N.; DIEZ, C. 9-cis-retinoic acid during in vitro maturation improves development of the bovine oocyte and increases midkine but not IGF-I expression in cumulus-granulosa cells. **Molecular Reproduction and Development**, v.66, n.3, p.247-255, 2003.

GOOVAERTS, I. G. F.; LEROY, J. L. M. R.; RIZOS, D.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; JORSSSEN, E. P. A.; BOLS, P. E. J. Single in vitro bovine embryo production: Coculture with autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and gene expression profiles. **Theriogenology**, v.76, n.7, p.1293-1303, 2011.

GUERIN, P.; EL, M. 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.

GUTIERREZ-ADAN, A.; RIZOS, D.; FAIR, T.; MOREIRA, P. N.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.68, n.4, p.441-448, 2004.

HARRIS, A. D.; MOORE, T. Vitamin-A in Infective Hepatitis. **British Medical Journal**, v.1, n.4503, p.553-558, 1947.

HATTORI, M.; TAKESUE, K.; NISHIDA, N.; KATO, Y.; FUJIHARA, N. Inhibitory effect of retinoic acid on the development of immature porcine granulosa cells to mature cells. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.25, n.1, p.53-61, 2000.

HIDALGO, C. O.; DIEZ, C.; DUQUE, F.; FACAL, N.; GOMEZ, E. Pregnancies and improved early embryonic development with bovine oocytes matured in vitro with 9-cis-retinoic acid. **Reproduction**, v.125, n.3, p.409-416, 2003.

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

HUANG, F. J.; WU, T. C. J.; TSAI, M. Y. Effect of retinoic acid on implantation and post-implantation development of mouse embryos in vitro. **Human Reproduction**, v.16, n.10, p.2171-2176, 2001.

IKEDA, S.; ICHIHARA-TANAKA, K.; AZUMA, T.; MURAMATSU, T.; YAMADA, M. Effects of midkine during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent developmental competence. **Biology of Reproduction**, v.63, n.4, p.1067-1074, 2000.

IMAM, A.; HOYOS, B.; SWENSON, C.; LEVI, E.; CHUA, R.; VIRIYA, E.; HAMMERLING, U. Retinoids as ligands and coactivators of protein kinase C alpha. **Faseb Journal**, v.15, n.1, p.28-30, 2001.

IZADYAR, F.; HAGE, W. J.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v.49, n.4, p.444-453, 1998.

JANG, H. Y.; JI, S. J.; KIM, Y. H.; LEE, H. Y.; SHIN, J. S.; CHEONG, H. T.; KIM, J. T.; PARK, I. C.; KONG, H. S.; PARK, C. K.; YANG, B. K. Antioxidative Effects of Astaxanthin against Nitric Oxide-Induced Oxidative Stress on Cell Viability and Gene Expression in Bovine Oviduct Epithelial Cell and the Developmental Competence of Bovine IVM/IVF Embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, n.6, p.967-974, 2010.

KIM, T. S.; LEE, S. H.; GANG, G. T.; LEE, Y. S.; KIM, S. U.; KOO, D. B.; SHIN, M. Y.; PARK, C. K.; LEE, D. S. Exogenous DNA Uptake of Boar Spermatozoa by a Magnetic Nanoparticle Vector System. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, n.5, p.E201-E206, 2010.

LABHASETWAR, V.; SONG, C. X.; LEVY, R. J. Nanoparticle drug delivery system for restenosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.24, n.1, p.63-85, 1997.

LAMMERS, T.; AIME, S.; HENNINK, W. E.; STORM, G.; KIESSLING, F. Theranostic Nanomedicine. **Accounts of Chemical Research**, v.44, n.10, p.1029-1038, 2011.

LARSON, J. E.; KRISHER, R. L.; LAMB, G. C. Effects of supplemental progesterone on the development, metabolism and blastocyst cell number of bovine embryos produced in vitro. **Reproductoin, Fertility and Development**, v.23, n.2, p.311-318, 2011.

LIANG, S.; KANG, J.; JIN, H.; LIU, X.; LI, J.; LI, S.; LU, Y.; WANG, W.; YIN, X. J. The influence of 9-cis-retinoic acid on nuclear and cytoplasmic maturation and gene

expression in canine oocytes during in vitro maturation. **Theriogenology**, v.77, n.6, p.1198-1205, 2012.

LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M. A. L.; GONCALVES, P. B. D.; MONTAGNER, M. M.; REICHENBACH, H. D.; WEPPERT, M.; NETO, C. C. C.; PINA, V. M. R.; SANTOS, M. H. B. Effects of retinol on the in vitro development of *Bos indicus* embryos to blastocysts in two different culture systems. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, n.5, p.356-360, 2004.

LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M. A. L.; SANTOS, M. H. B.; REICHENBACH, H. D.; WEPPERT, M.; PAULA-LOPES, F. F.; NETO, C. C. C.; GONCALVES, P. B. D. Effect of retinoids and growth factor on in vitro bovine embryos produced under chemically defined conditions. **Animal Reproduction Science**, v.95, n.3-4, p.184-192, 2006.

LIU, Z. S.; FOOTE, R. H. Development of Bovine Embryos in Ksom with Added Superoxide-Dismutase and Taurine and with 5-Percent and 20-Percent O-2. **Biology of Reproduction**, v.53, n.4, p.786-790, 1995.

LIVINGSTON, T.; EBERHARDT, D. M.; EDWARDS, J. L.; GODKIN, J. D. Retinol improves bovine embryonic development in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.2, p.83-89, 2004.

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

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A. C. O. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v.65, n.1, p.137-152, 2006.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M. P. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression - experience from animal studies. **Reproduction Biomedicine Online**, v.7, n.6, p.657-663, 2003.

MAKHLUF, S. B. D.; QASEM, R.; RUBINSTEIN, S.; GEDANKEN, A.; BREITBART, H. Loading magnetic nanoparticles into sperm cells does not affect their functionality. **Langmuir**, v.22, n.23, p.9480-9482, 2006.

MACHACA, K. Ca²⁺ signaling differentiation during oocyte maturation. **Journal of Cellular Physiology**, v.213, n.2, p.331-340, 2007.

MACHATY, Z.; PEIPPO, J.; PETER, A. Production and manipulation of bovine embryos: Techniques and terminology. **Theriogenology**, v.78, n.5, p.937-950, 2012.

MANGELSDORF, D. J.; EVANS, M. The RXR heterodimers and orphan receptors. **Cell**, v.83, p.841–850, 1995.

MAHAPATRO, A.; SINGH, D. K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. **Journal of Nanobiotechnology**, v.9, p.55, 2011.

MAMO, S.; PONSUKSILI, S.; WIMMERS, K.; GILLES, M.; SCHELLANDER, K. Expression of retinoid X receptor transcripts and their significance for developmental competence in in vitro-produced pre-implantation-stage bovine embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v.40, n.2, p.177-183, 2005.

MELKA, M. G.; RINGS, F.; HOLKER, M.; THOLEN, E.; HAVLICEK, V.; BESENFELDER, U.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Expression of Apoptosis Regulatory Genes and Incidence of Apoptosis in Different Morphological Quality Groups of In Vitro-produced Bovine Pre-implantation Embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, n.5, p.915-921, 2010.

MINEGISHI, T.; HIRAKAWA, T.; KISHI, H.; ABE, K.; TANO, M.; ABE, Y.; MIYAMOTO, K. The mechanisms of retinoic acid-induced regulation on the follicle-stimulating hormone receptor in rat granulosa cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1495, n.3, p.203-211, 2000.

MINGOTI, G. Z.; CAIADO CASTRO, V. S.; MEO, S. C.; BARRETTO, L. S.; GARCIA, J. M. The effect of interaction between macromolecule supplement and oxygen tension on bovine oocytes and embryos cultured in vitro. **Zygote**, v.17, n.4, p.321-328, 2009.

MOHAN, M.; MALAYER, J. R.; GEISERT, R. D.; MORGAN, G. L. Expression of retinol-binding protein messenger RNA and retinoic acid receptors in preattachment bovine embryos. **Molecular Reproduction Development**, v.60, n.3, p.289-296, 2001.

MOHAN, M.; MALAYER, J. R.; GEISERT, R. D.; MORGAN, G. L. Expression patterns of retinoid X receptors, retinaldehyde dehydrogenase, and peroxisome proliferator activated receptor gamma in bovine preattachment embryos. **Biology of Reproduction**, v.66, n.3, p.692-700, 2002.

MOHAN, M.; THIRUMALAPURA, N.; MALAYER, J. R. Bovine cumulus-granulosa cells contain biologically active retinoid receptors that can respond to retinoic acid. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.104, n.1, 2013.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.385, n.1-2, p.113-142, 2010.

MORADO, S. A.; CETICA, P. D.; BECONI, M. T.; DALVIT, G. C. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, v.21, n.4, p.608-614, 2009.

MORRISS-KAY, G. M.; WARD, S. J. Retinoids and mammalian development. **International Review of Cytology**, v.188, p.73-131, 1999.

NASIRI, E.; MAHMOUDI, R.; BAHADORI, M. H.; AMIRI, I. The Effect of Retinoic Acid on In vitro Maturation and Fertilization Rate of Mouse Germinal Vesicle Stage Oocytes. **Cell Journal**, v.13, n.1, p.19-24, 2011.

OLSON, J. A. Vitamin-A and Carotenoids As Antioxidants in A Physiological Context. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.39, p.S57-S65, 1993.

OPIELA, J.; KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; LIPINSKI, D.; SLOMSKI, R.; BZOWSKA, A.; RYNSKA, B. Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. **Theriogenology**, v.69, n.5, p.546-555, 2008.

OURIQUE, A. F.; AZOUBEL, S.; FERREIRA, C. V.; SILVA, C. B.; MARCHIORI, M. C. L.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Lipid-Core Nanocapsules as a Nanomedicine for Parenteral Administration of Tretinoin: Development and In Vitro Antitumor Activity on Human Myeloid Leukaemia Cells. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.6, n.3, p.214-223, 2010.

OURIQUE, A. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **International Journal Pharmaceutics**, v.352, n.1-2, p.1-4, 2008.

OYAMADA, T.; FUKUI, Y. Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. **Journal of Reproduction and Development**, v.50, n.1, p.107-117, 2004.

PANT, D.; KEEFER, C. L. Expression of Pluripotency-Related Genes during Bovine Inner Cell Mass Explant Culture. **Cloning and Stem Cells**, v.11, n.3, p.355-365, 2009.

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M. A.; FIRST, N. L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v.38, n.5, p.1171-1180, 1988.

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRITSER, E. S.; EYESTONE, W. H.; FIRST, N. L. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v.25, n.4, p.591-600, 1986.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.9, 2001.

POMAR, F. J. R.; TEERDS, K. J.; KIDSON, A.; COLENBRANDER, B.; THARASANIT, T.; AGUILAR, B.; ROELEN, B. A. J. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. **Theriogenology**, v.63, n.8, p.2254-2268, 2005.

RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.44-50, 2008.

RODRIGUEZ, A.; DIEZ, C.; IKEDA, S.; ROYO, L. J.; CAAMANO, J. N.; ALONSO-MONTES, C.; GOYACHE, F.; ALVAREZ, I.; FACAL, N.; GOMEZ, E. Retinoids during the in vitro transition from bovine morula to blastocyst. **Human Reproduction**, v.21, n.8, p.2149-2157, 2006.

ROYO, L. J.; DIEZ, C.; GOYACHE, F.; DUQUE, P.; ALVAREZ, I.; HIDALGO, C.; GOMEZ, E. Bovine cumulus-granulosa cells express increased midkine but not IGF-1 in response to 9-*cis* retinoic acid during in vitro maturation [abstract]. **Theriogenology**, v.59, p.431, 2003.

RUSSELL, D. F.; BAQIR, S.; BORDIGNON, J.; BETTS, D. H. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, n.10, p.1255-1270, 2006.

SCHULTZ, R. M.; KOPF, G. S. Molecular-Basis of Mammalian Egg Activation. **Current Topics in Developmental Biology**, Vol 30, v.30, p.21-62, 1995.

SHAH, K. A.; DATE, A. A.; JOSHI, M. D.; PATRAVALE, V. B. Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: Potential in topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.345, n.1-2, p.163-171, 2007.

SIRARD, M. A. Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.28, n.6, p.483-488, 2011.

SOPRANO, D. R.; QIN, P.; SOPRANO, K. J. Retinoic acid receptors and cancers. **Annual Review of Nutrition**, v.24, p.201-221, 2004.

SOMFAI, T.; INABA, Y.; WATANABE, S.; GESHI, M.; NAGAI, T. Follicular fluid supplementation during in vitro maturation promotes sperm penetration in bovine oocytes by enhancing cumulus expansion and increasing mitochondrial activity in oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v.24, n.5, p.743-752, 2012.

SORIA, G. F. **Embriões bovinos desenvolvidos em sistemas de cultivos quimicamente definidos ou suplementados com fontes protéicas**. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

STROUD, B. Statistics and Data Retrieval Committee Report. The year 2012 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. **IETS Newsletter**, v.30, p.16–26, 2012.

STEIN, A. Decreasing variability in your cell culture. **Biotechniques**, v.43, n.2, p.228-229, 2007.

SUWANSA-ARD, S.; KANATHARANA, P.; ASAWATRERATANAKUL, P.; WONGKITTISUKSA, B.; LIMSAKUL, C.; THAVARUNGKUL, P. Comparison of surface plasmon resonance and capacitive immunosensors for cancer antigen 125 detection in human serum samples. **Biosensors & Bioelectronics**, v.24, n.12, p.3436-3441, 2009.

TAHAEI, L. S.; EIMANI, H.; YAZDI, P. E.; EBRAHIMI, B.; FATHI, R. Effects of retinoic acid on maturation of immature mouse oocytes in the presence and absence of a granulosa cell co-culture system. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.28, n.6, p.553-558, 2011.

TANG, X. H.; GUDAS, L. J. Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. **Annual Reviews Pathology**, v.6, p.345-364, 2011.

TARAZONA, A. M.; RODRIGUEZ, J. I.; RESTREPO, L. F.; OLIVERA-ANGEL, M. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, n.1, p.5-11, 2006.

TOMEK, W.; TORNER, H.; KANITZ, W. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, n.2, p.86-91, 2002.

YANG, P. T.; HOANG, L. E.; JIA, W. W.; SKARSGARD, E. D. In Utero Gene Delivery Using Chitosan-DNA Nanoparticles in Mice. **Journal of Surgical Research**, v.171, n.2, p.691-699, 2011.

ZHANG, M.; SU, Y. Q.; SUGIURA, K.; XIA, G.; EPPIG, J. J. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science**, v.330, n.6002, p.366-369, 2010.

ZHENG, P.; SI, W.; BAVISTER, B. D.; YANG, J.; DING, C.; JI, W. 17Beta-estradiol and progesterone improve in-vitro cytoplasmic maturation of oocytes from unstimulated prepubertal and adult rhesus monkeys. **Human Reproduction**, v.18, n.10, p.2137-2144, 2003.