



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NAIANE MARINHEIRO SANTOS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA DROGA ANTIMALÁRICA ARTESUNATO SOBRE A
MATURAÇÃO NUCLEAR *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS.

CAPITÃO POÇO

2018

NAIANE MARINHEIRO SANTOS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA DROGA ANTIMALÁRICA ARTESUNATO SOBRE A
MATURAÇÃO NUCLEAR *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural da Amazônia como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Dr^a. Priscila di Paula Bessa Santana

CAPITÃO POÇO

2018

NAIANE MARINHEIRO SANTOS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA DROGA ANTIMALÁRICA ARTESUNATO SOBRE A
MATURAÇÃO NUCLEAR *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural da Amazônia como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Dr^a. Priscila di Paula Bessa Santana

Data de Aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Priscila di Paula Bessa Santana
Universidade Federal Rural da Amazônia
Orientador

Prof^o. Dr^o. Davidson Clayton Azevedo Sodré
Universidade Federal Rural da Amazônia
Membro da banca

Prof^a. Dr^a. Julianne Silva de Lima
Universidade do Estado do Pará
Membro da banca

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos, esposo e familiares que me apoiaram e acreditaram que eu seria capaz de alcançar meus objetivos.

Aos meus sobrinhos Eduardo e João Lucas e a todos os amigos que participaram de forma direta ou indireta na realização dessa etapa de minha vida.

AGRADECIMENTO

A Deus pelo dom da vida

Aos meus pais Nazareno e Maria Ivaneide, pela excelente criação que me deram e por todo o apoio nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos, Neybson e Nangela, por serem meus melhores amigos e me fazerem sorrir até mesmo nos momentos de tristeza.

A meu marido que sempre me apoiou, incentivou e acima de tudo, entendeu os momentos em que tive que deixá-lo um pouco de lado por conta dos estudos.

A toda família Crispim, primas, primos, tios e tias, em especial a minha prima Valdicléia por todo seu apoio.

A minha orientadora que me deu todo o apoio necessário para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao meu amigo Paulo Benevides, pelo bom convívio que tivemos, pela paciência e por sua grande amizade.

A minha amiga Camila Samara, por ter estado ao meu lado desde o início do curso, pelas palavras de conforto e incentivo quando precisei.

As amigas, Vanessa, Signe e Thuane por me apoiarem nos momentos de desespero de tantos trabalhos.

A Mônica, Nadine e Thalita por me ajudarem na parte de coleta de dados deste trabalho.

Aos meus colegas de turma, que mesmo com toda discórdia nos momentos certos fomos unidos.

A dona Marlene por ter me acolhido tão bem na sua casa.

A todas as pessoas do Laboratório de Fertilização *In Vitro*, pela colaboração.

É bom saber que
não estou pronto para tudo,
mas que por nada troco
o que está por vir.

Wolf Borges

RESUMO

O Objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dose-resposta da droga antimalárica artesunato sobre a maturação nuclear e desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos. Os grupos experimentais foram: Controle sem a presença de artesunato (CT), grupos com 0,5 ug/ml (ARS1), 1 ug/ml (ARS2) e 2 ug/ml (ARS3) de artesunato. Os oócitos oriundos de abatedouro foram maturados *in vitro* (MIV) e posteriormente metade dos oócitos de cada grupo experimental foi corada com orceína acética a 1% para visualização sob microscopia óptica (1000x), a fim de investigar a presença do primeiro corpúsculo polar, indicativo de maturação nuclear. Já a outra metade foi submetida à fecundação e cultivo *in vitro* para a averiguar a taxa de clivagens no 2º dia e blastocisto no 7º dia de desenvolvimento embrionário. Para a interpretação dos dados foi utilizada análise de variância (ANOVA), com significância de 5% no programa BioEstat 5.0. Como resultado, não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) das taxas de maturação nuclear entre os grupos CT ($72,3 \pm 6,7$), ARS1 ($75,7 \pm 12,1$), ARS2 ($63,3 \pm 8,9$) e ARS3 ($84,6 \pm 13,7$). Também não foram constatadas diferenças estatísticas para as taxas de blastocisto ($p > 0,05$) entre os grupos CT ($38,3 \pm 2,8$), ARS1 ($26,2 \pm 10,9$), ARS2 ($27,9 \pm 10,9$) e ARS3 ($30,8 \pm 6,2$). Portanto, estes resultados indicam que as concentrações de ARS utilizadas neste estudo não foram suficientes para afetar significativamente as taxas de maturação nuclear e a formação de blastocistos dos oócitos tratados com o artesunato durante a MIV. Contudo, evidências indicam que a ação de ARS é dose-dependente e em altas concentrações como 7,5, 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ aumentam a incidência de quebras ao DNA, tendo assim um efeito genotóxico em células cultivadas *in vitro*. Diante do exposto, especulamos que o ARS afete os aspectos moleculares de qualidade oocitária e posteriormente do embrião que não foram evidenciados em termos das taxas medidas neste trabalho. Concluímos que, nas condições investigadas, o ARS não influenciou a maturação nuclear e o potencial de desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos maturados *in vitro*.

Palavras chaves: Artesunato; Maturação nuclear; Bovino; PIVE.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the dose-response effect of the antimalarial artesunate drug on nuclear maturation and embryo development in vitro of bovine oocytes. The experimental groups were: Control without artesunate (CT), groups with 0.5 ug/ml (ARS1), 1 ug/ml (ARS2) and artesunate 2 ug/ml (ARS3). The oocytes from the slaughterhouse were matured in vitro (IVM) and later half of the oocytes from each experimental group were stained with 1% acetic orcein for visualization under light microscopy (1000x), in order to investigate the presence of the first polar, indicative corpuscle of nuclear maturation. The other half was submitted to fecundation and in vitro culture to determine the rate of cleavage on day 2 and blastocyst on the 7th day of embryonic development. For the interpretation of the data, analysis of variance (ANOVA) was used, with a significance of 5% in the BioEstat 5.0 program. As a result, there was no statistical difference ($p > 0.05$) in the nuclear maturation rates between the CT groups (72.3 ± 6.7), ARS1 (75.7 ± 12.1), ARS2 (63.3 ± 8.9) and ARS3 (84.6 ± 13.7). Statistical differences were also not found for the blastocyst rates ($p > 0.05$) among the groups CT (38.3 ± 2.8), ARS1 (26.2 ± 10.9), ARS2 ($27.9 \pm 10, 9$) and ARS3 (30.8 ± 6.2). Therefore, these results indicate that the ARS concentrations used in this study were not sufficient to significantly affect the rates of nuclear maturation and blastocyst formation of artesunate-treated oocytes during IVM. However, evidence indicates that the action of ARS is dose-dependent and at high concentrations such as 7.5, 10 and 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ increase the incidence of DNA breaks, thus having a genotoxic effect on cells cultured in vitro. Considering the above, we speculate that the ARS affects the molecular aspects of oocyte quality and later of the embryo that were not evidenced in terms of the rates measured in this work. We concluded that, under the conditions investigated, ARS did not influence the nuclear maturation and the embryonic development potential of bovine oocytes matured in vitro.

Keywords: Artesunate; Nuclear maturation; Bovine; IVEP.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Avaliação do estágio de maturação nuclear do grupo controle negativo (CT) após a MIV. As setas pretas indicam a presença do núcleo em metáfase em A) e B).21
- Figura 2-** Avaliação do estágio de maturação nuclear do grupo ARS1 após a MIV. As setas pretas indicam o núcleo em A) metáfase (cromossomos alinhados na linha equatorial do fuso mitótico) e B) prófase.22
- Figura 3-** Avaliação do estágio de maturação nuclear do grupo ARS2 após a MIV. As setas pretas indicam o núcleo em A) anáfase e B) prófase.23
- Figura 4 -** Avaliação do estágio de maturação nuclear do grupo ARS3 após a MIV. As setas pretas indicam o núcleo em A) prófase e B) metáfase (cromossomos alinhados no fuso mitótico).24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito do artesunato na taxa de maturação de oócitos.....	20
Tabela 2 - Efeito do artesunato sobre as taxas de clivagens e blastocistos.	25

LISTA DE SIGLAS

ARS – Artesunato

TCA – Terapia de Combinação das Artemisininas

PIVE – Produção *in vitro* de embriões

MIV – Maturação *in vitro*

FIV – Fertilização *in vitro*

CIV – Cultivo *in vitro*

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

ANOVA – Análise de Variância

CO₂ – Dióxido de carbono

mRNAs – Acido Ribonucleico Mensageiro

CCOs – Complexo *Cumulus- oócito*

TCM 199 – Meio de Cultivo Tecidual 199

SFB – Soro Fetal Bovino

SOCIPE – Sociedade Cooperativa dos Pecuaristas

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

LH – Hormônio Luteinizante

TALP – “Tyrode’s Albumin Lactate and Pyruvate”

BSA – Soro Fetal Bovino

SOF – Fluido Sintético de Oviduto

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Malária: uma doença endêmica na região Amazônica	13
2.2 Drogas antimaláricas e seus efeitos celulares	13
2.3 Relação da maturação oocitária e desenvolvimento embrionário	14
2.4 Produção <i>in vitro</i> de embriões	15
3. OBJETIVOS	16
4. JUSTIFICATIVA	16
5. MATERIAL E MÉTODOS	17
5.1 Obtenção de Ovários	17
5.2 Punção Folicular e Seleção de Oócitos	17
5.3 Maturação <i>In Vitro</i> (MIV)	17
5.4 Visualização da Maturação nuclear por coloração com orceína-acética	18
5.5 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	18
5.6 Análise estatística	19
6. RESULTADOS	20
7. DISCUSSÃO	25
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1. INTRODUÇÃO

A malária é uma parasitose causada pelo protozoário *Plasmodium*, considerada endêmica de regiões tropicais. No Brasil essa doença afeta principalmente as regiões que compõem a Amazônia legal, onde os maiores índices de contaminação estão concentrados no estado do Amazonas, sendo este responsável por 99% da ocorrência de casos da doença no país. Isso ocorre, pois, o estado do Amazonas apresenta características socioambientais que favorecem a proliferação do parasita (BOARETO, 2007; MONTEIRO et al, 2013; MOTA, 2015).

O tratamento da malária é feito por meio da terapia de combinação das artemisininas (TCA), sendo o artesunato (ARS) um derivado da artemisinina muito eficaz, principalmente em casos de contaminação pela espécie *Plasmodium falciparum*, sendo este o caso mais grave da doença, uma vez que este parasita apresenta resistência ao tratamento com outros antimaláricos (WHO, 2013). Porém a literatura tem demonstrado que o artesunato apresenta toxicidade no período pré-implantacional em modelos animais e apesar dessa droga não apresentar os mesmos efeitos em humanos é necessário uma maior investigação quanto à segurança desse medicamento no período gestacional (WHO, 2003).

A maturação *in vitro* é a etapa mais importante da produção *in vitro* de embriões, pois o desenvolvimento embrionário subsequente depende da eficácia da maturação nuclear e citoplasmática do oócito. A maturação nuclear consiste nas modificações que o oócito sofre durante a progressão do estágio de metáfase I até metáfase II, enquanto que a citoplasmática é o evento marcado por diversas alterações moleculares e estruturais no citoplasma (CHAVES et al, 2010).

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) consiste em três etapas laboratoriais: a maturação *in vitro* (MIV), a fertilização *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) de embriões. Essa biotécnica tem sido utilizada como uma importante ferramenta tanto na reprodução de animais, como para o teste de substâncias químicas e fármacos fitoterápicos e quimioterápicos com ação desconhecida para o organismo humano. Sendo portanto utilizados modelos animais para os testes, e os resultados são extrapolados para humanos (ANDREOTI, 2007). Além de ser uma excelente ferramenta para o estudo de fenômenos biológicos que ocorrem durante as etapas da PIVE (GONÇALVES, 2007).

Diante do exposto, esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito dose-resposta da droga antimalárica artesunato sobre a maturação nuclear e desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Malária: uma doença endêmica na região Amazônica

A Malária é uma doença infecciosa, transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Anophelles* contaminado com protozoário do gênero *Plasmodium* das espécies *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* e *P. ovale*, porém podem ocorrer contaminações por transfusão sanguínea, condições congênitas, ou uso de seringas contaminadas (MIOTO; GALHARDI & AMARANTE, 2012). Dentre as espécies a *P. falciparum* é responsável pela forma mais grave da malária, também conhecida como febre terçã maligna (MOTA, 20011).

No ano de 2015 foram notificados, 214 milhões de casos de malária e 438 mil mortes no mundo (WMD, 2016). Essa parasitose é endêmica de países tropicais, principalmente África, América Central, América do Sul e Ásia (WHO, 2015).

No Brasil é considerada um problema de saúde pública que afeta significativamente a região da Amazônia Legal, área que compreende os estados do Acre, Rondônia, Amazonas, Pará, Tocantins, Maranhão, Amapá, Mato Grosso e Roraima (MIOTO et al, 2012; MOTA, 2015; OLIVEIRA et al, 2009), sendo esta área responsável por cerca de 99,7% dos casos de malária no país no ano de 2011, isso se deve ao fato de que a Amazônia possui condições socioeconômicas e ambientais que favorecem a proliferação do vetor da doença, (BRASIL, 2013).

De acordo com o relatório de saúde do Sistema Nacional de Vigilância em Saúde (2011), somente no ano de 2010 foram notificados 136.476 casos de malária no estado do Pará, isso equivale a 42% do total de casos notificados no país no ano de 2013. Portanto, se comparados aos casos notificados em 2009 observa-se um aumento de 36% dos casos de malária no estado.

Dados de junho de 2015 os quais foram publicados pela Secretaria de Vigilância em Saúde demonstram que o estado do Pará ocupa o sexto lugar, dentre os nove estados pertencentes à Amazônia legal que são afetados pela malária (BRASIL, 2015).

2.2 Drogas antimaláricas e seus efeitos celulares

A Organização Mundial da Saúde recomenda que o tratamento da malária seja feito por meio da administração de medicamentos derivados da artemisinina, assim como o artesunato (AQUINO, 2011). Contudo, não há muitos trabalhos que demonstrem *in vitro* o mecanismo de ação desse antimalárico. Porém para outras drogas antimaláricas como a

primaquina e a cloroquina estudos demonstram efeitos genotóxicos *in vitro* (FAROMBI, 2006)

O artesunato é um monoéster, hidrossolúvel, o qual após 1987 passou a ser utilizado para o tratamento da malária causada por *P. falciparum*, pois não apresenta muitos efeitos colaterais graves ou resistências farmacológicas (GOU, 2016).

É considerado o principal fármaco utilizado para o tratamento da malária cerebral. A dosagem recomendada é de 4 mg/kg, porém, sua eficácia aumenta se associado a outros antimaláricos, assim como a mefloquina (WHO, 2015).

A ação do artesunato é principalmente sobre os eritrócitos infectados com trofozoítos em estágios anelares, reduzindo os sintomas e a transmissão dessa parasitose (FERNANDEZ et al, 2016). Contudo, estudos comprovam que o artesunato possui ação citotóxica e genotóxica, e induz a formação de EROs (espécies reativas de oxigênio) e outros radicais livres que provocam alterações no DNA, e consequentemente a ativação da apoptose (AQUINO, 2010; MOTA, 2011) além de estar relacionado com a toxicidade reprodutiva para o trato reprodutor masculino e feminino, induzindo casos de embriotoxicidade em camundongos (BOARETO, 2007; SOUZA, 2016). Os estudos sobre a toxicidade reprodutiva do artesunato estão relacionados principalmente a toxicidade mãe-feto no período gestacional (BOARETO, et al, 2008). Uma vez que essa droga reduz os níveis séricos de progesterona e provoca degeneração da decídua em fetos de ratas no início da gestação. (LOU & ZHOU, 2001).

2.3 Relação da maturação oocitária e desenvolvimento embrionário

A fase de maturação oocitária é onde os oócitos adquirem competência para sustentar as próximas etapas do desenvolvimento embrionário (PEREIRA, 2016). O mecanismo de maturação oocitária compreende três aspectos: a maturação nuclear, citoplasmática e molecular (GOTTARD & MINGOTI, 2009) e engloba uma série de transformações bioquímicas e estruturais pelo qual o oócito adquire a capacidade de ser fertilizado e de dar suporte ao desenvolvimento embrionário inicial (CHAVES et al, 2010; PEREIRA et al, 2016). Porém essas modificações não ocorrem somente no núcleo, como também no citoplasma, de maneira independente (CHAVES et al, 2010).

A maturação nuclear é caracterizada pela condensação da cromatina, desaparecimento do nucléolo e desintegração da membrana celular, ou seja, a quebra da vesícula germinativa, além da condensação dos cromossomos, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico, portanto, é o progresso do oócito da fase de prófase I da primeira meiose até a metáfase II da segunda divisão meiótica (KIM, 2008).

Para a maturação citoplasmática, o conjunto de modificações que ocorrem estão relacionadas à distribuição e organização das organelas celulares, tais como, os grânulos corticais, estocagem de RNA e proteínas (ANGUITA et al, 2007).

Enquanto a maturação molecular consiste no processo de transcrição e processamento de mRNAs que serão traduzidos em proteínas pelos ribossomos, proteínas as quais estão envolvidas no mecanismo de maturação e nos etapas celulares seguintes, tais como fecundação, formação dos pronúcleos e início da embriogênese (GONÇALVES et al, 2007). Porém sabe-se que diversas substâncias químicas podem afetar a maturação oocitária e o subsequente desenvolvimento embrionário.

Sendo assim, a PIVE tem sido uma importante ferramenta utilizada para o teste *in vitro* de fármacos e substâncias químicas cujo mecanismo de ação sobre a maturação oocitária seja desconhecido ou pouco estudado. A exemplo disso, temos o estudo realizado por Saraiva (2006), o qual analisa os efeitos da demecolcina, droga utilizada no tratamento da linfoma de Hodgkin para a maturação e desenvolvimento *in vitro* de oócitos bovinos. Sendo constatado que houve ação prejudicial da demecolcina na extrusão do primeiro corpúsculo polar, no entanto, apesar dessa droga ter apresentado um retardo na progressão da maturação nuclear, não afetou a maturação citoplasmática e o subsequente desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Outra substância que tem seu mecanismo de ação sobre a maturação oocitária comprovado por meio de testes *in vitro* é a *Auxemma oncocalix*, droga alternativa para o tratamento do câncer (BOARETO et al, 2013). A adição dessa substância na MIV afetou negativamente a eficiência da FIV e as taxas de clivagens e blastocistos (REVILLA, 2016).

2.4 Produção *in vitro* de embriões

As biotécnicas aplicadas na reprodução animal auxiliam a seleção e melhoramento genético em animais de produção (DODE; MARTINS & SIQUEIRA 2011). E também o estudo e compreensão de diversos mecanismos biológicos que ocorrem durante a maturação dos oócitos, capacitação espermática, fecundação e o início do desenvolvimento embrionário (HOSHI, 2003).

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica reprodutiva que permite a manipulação de gametas masculinos e femininos fora do trato reprodutivo da fêmea, resultando na formação de um novo indivíduo. O processo envolve as etapas de coleta dos oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) (GONÇALVES et al, 2008).

A maturação *in vitro* de oócitos consiste na fase da PIVE onde ocorrem diversas modificações citoplasmáticas, nucleares e moleculares relacionadas ao processo de capacitação do gameta feminino para o momento da fecundação e posteriormente o cultivo embrionário *in vitro*. (GONÇALVES et al, 2008). Essas modificações são marcadas pela retomada do ciclo celular da fase de prófase I até a metáfase da segunda divisão meiótica (MERTON et al, 2003).

Após completar a maturação dos oócitos ocorre à fertilização, processo este pelo qual ocorre a união entre os oócitos e espermatozoides, processo este que resulta na formação do zigoto, o qual será incubado em meio de cultivo adequado para promover a capacitação espermática e a fecundação (MACHATY et al, 2012).

O cultivo *in vitro* é marcado por uma sequência de divisões celulares do embrião até o estágio de mórula. Em seguida, há a formação do blastocisto, onde as células irão diferenciar-se para dar origem a massa celular interna (feto), trofotoderma (anexos embrionários) e a cavidade denominada de blastocele. Este processo tem duração de 7 dias e o sucesso dessa etapa assim como das que a antecede depende das condições de cultivo e manipulação adequadas (BARRONDO, 2013).

A PIVE é uma ferramenta de grande utilidade em diversos âmbitos, pois além de viabilizar a reprodução em larga escala de rebanhos com alto valor agregado ela atua no processo de identificação de substâncias prejudiciais ou benéficas para oócitos e embriões cultivados *in vitro*. São muitas as vias que os agentes químicos podem interferir na maturação oocitária, por exemplo, agentes quimioterápicos podem afetar o fuso do oócito durante a divisão meiótica, causando alterações cromossômicas (REVILLA, 2016)

3. OBJETIVOS

- Avaliar o efeito dose-resposta da droga antimalárica artesunato sobre a maturação nuclear e desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos.

4. JUSTIFICATIVA

Considerando que o artesunato (ARS) apresenta danos oxidativos e apoptose em células ovarianas de Hamsters (LI et al, 2008) e reabsorção embrionária dose-dependente em ratos, causando malformações e mortes (BOARETO et al. 2012). Além disso, estudos indicam que a ação do ARS é dose-dependente e em altas concentrações aumentam a incidência de quebras ao DNA, tendo assim um efeito genotóxico em células cultivadas *in*

vitro (AQUINO et al. 2013). Desta forma, especulamos que o ARS afete os aspectos moleculares de qualidade oocitária e posteriormente do embrião.

Diante do exposto, este estudo propõe investigar os efeitos dose-resposta da droga antimalárica artesunato sobre a maturação nuclear e desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Obtenção de Ovários

Os ovários utilizados para a realização da maturação *in vitro*, são provenientes do abatedouro e frigorífico SOCIPE (Sociedade Cooperativa dos Pecuaristas) Cooperativa da Indústria localizada no bairro Tapanã, rodovia Arthur Bernardes, Belém – PA. Os ovários foram coletados imediatamente após o abate e acondicionados em potes de vidro contendo solução salina de cloreto de sódio a 0,9% estéril, em seguida foram transportados em caixa térmica até o Laboratório de Fertilização *In Vitro* do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, onde foi realizada a punção dos folículos ovarianos.

5.2 Punção Folicular e Seleção de Oócitos

A punção dos folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm foi realizada com o auxílio de uma agulha 40 x 12 acoplada a uma seringa de 20 ml, em seguida o líquido folicular aspirado foi transferido para tubos cônicos de polietileno de 15 ml e aguardou-se cerca de 10 a 15 minutos até que houvesse a formação do pellet (sedimento). Posteriormente, esse pellet foi transferido para uma placa de petri de polietileno de 35 mm de diâmetros contendo TCM 199 acrescido 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 10 µl de piruvato e 25 µl de gentamicina.

A seleção do complexo *cumulus oophorus* (CCOs) foi realizado em um estereomicroscópio sob fluxo laminar. Os CCOs encontrados foram aspirados para dentro do capilar e transferidos para gotas de meio de maturação *in vitro* (MIV), composto por TCM 199 (meio de cultura de tecidos) suplementado com sais de Earle, 10% de Soro fetal bovino (SFB), gentamicina, piruvato, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) e armazenados em estufa de cultivo com atmosfera de 5% de CO₂ e 38°C de temperatura.

5.3 Maturação *In Vitro* (MIV)

O meio utilizado para a maturação dos oócitos foi formulado de acordo com o protocolo do Laboratório de FIV, composto por TCM 199 (meio de cultura de tecidos), com sais de Earle,

suplementado com 10% de Soro fetal bovino (SFB), gentamicina, piruvato, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH).

As placas foram montadas com gotas de 100 µl de meio cobertas com óleo mineral estéril. Os oócitos selecionados foram transferidos para placa de MIV, onde se procedeu três lavagens e logo após foram transferidos para as gotas de maturação, a incubação ocorreu em estufa de cultivo com atmosfera de 5% de CO₂ a 38°C, por um período de 24 horas.

5.4 Visualização da Maturação nuclear por coloração com orceína-acética

Para a análise da maturação nuclear oocitária foi observada a presença do primeiro corpúsculo polar sob estereomicroscópio, e também por método de coloração histológica utilizando orceína acética. Primeiramente, foi feita a retirada das células do *cumulus* utilizando a enzima hialuronidase previamente aquecida a 38°C. Foram feitas sucessivas pipetagens até a total remoção das células do *cumulus*.

Para a coloração das lâminas histológicas foi necessário preparar o corante (orceína acética). Para isso, 5 gramas de orceína foram diluídas em 37,5 ml de metanol e 12,5 de ácido acético. Em seguida, a solução foi homogeneizada, filtrada em papel filtro e armazenada em um frasco âmbar.

Os oócitos denudos foram depositados em lâminas histológicas previamente preparadas para ter duas laterais vedadas com cola para manter os oócitos na lâmina durante o período de fixação em solução de ácido acético e metanol na proporção de 3:1.

Após 24 horas de incubação, foi realizada a montagem das lâminas. Para tanto, foram colocados 2 finos filamentos de parafina em duas extremidades da lâmina, em seguida os oócitos foram depositados com o mínimo de líquido possível então comprimidos sobre o peso da lamínula. Para a coloração foi adicionado cerca de 100 uL de corante pelas bordas não coladas, de maneira a preencher completamente o espaço entre a lâmina e a lamínula. Em seguida, as bordas da lamínula foram vedadas com esmalte, e as laminas foram analisadas.

5.5 Fecundação *in vitro* (FIV)

Para essa etapa foi utilizado sêmem bovino criopreservado em nitrogênio líquido, em função disso, foi necessário descongelar a palheta de sêmen em banho-maria a 37°C por 40 segundos. Após a descongelação, o sêmem foi depositado sob a coluna de 2 ml de percoll e centrifugado por 7 minutos a 3000rpm

O método do gradiente de percoll é o mais utilizado para fecundação *in vitro* de bovinos, sendo este utilizado para viabilizar a separação da fração espermática viva. Portanto, adiciona-se 1ml de percoll 90% na parte inferior de um eppendorf de 5,0 ml, e logo acima coloca-se o percoll 45%, o qual este foi obtido por meio da diluição em meio de FIV, composto por 5 ml de meio TALP, 0,03 µl de albumina sérica bovina (BSA), 10 µl piruvato, 25 µl de gentamicina, 55 µl de heparina e 220 µl de penicilina, hipotaurina e epinefrina (PHE).

Após a centrifugação houve a formação do pellet, o qual com o auxílio de uma pipeta automática foi transferido para placa contendo a heparina utilizada para auxiliar na capacitação espermática. Posteriormente os espermatozoides foram transferidos para a placa de fecundação contendo os oócitos maturados. A fecundação ocorreu em estufa de cultivo sob condições de 5% de CO₂ e 38°C por 24 horas.

5.6 Cultivo *in vitro* (CIV)

O cultivo *in vitro* corresponde à etapa de desenvolvimento do oócito fertilizado até o estágio de blastocisto. Os embriões foram cultivados em estufa de cultivo estabilizada em 38°C e 5% de CO₂ em meio de cultivo SOF (Fluído Sintético do Oviduto) suplementado com de soro fetal bovino (SFB), gentamicina e albumina sérica bovina (BSA) de acordo com o protocolo do laboratório. Posteriormente, foi realizado o vórtex dos possíveis embriões através de sucessivas pipetagens com o objetivo de remover as células do *cumulus* aderidas aos embriões. Porém as células do *cumulus* que ficaram aderidas ao fundo da placa durante a MIV, formando uma monocamada foram usadas como co-cultivo.

Os possíveis embriões foram analisados no segundo dia de desenvolvimento embrionário (D2), para observar as primeiras clivagens e no sétimo dia de desenvolvimento (D7), para identificar a formação dos blastocistos iniciais, expandidos e eclodidos.

5.7 Análise estatística

Para este estudo foram feitas 4 repetições os quais foram submetidos aos seguintes tratamentos: grupo controle sem a presença de artesunato (CT), e grupos com 0,5 ug/ml (ARS1), 1 ug/ml (ARS2) e 2 ug/ml (ARS3) de artesunato. Para a interpretação dos dados foi utilizada análise de variância (ANOVA), no programa BioEstat 5.0 com nível de significância de 5%. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão para as taxas de maturação, clivagens e blastocistos.

6. RESULTADOS

Análise da taxa de maturação nuclear

A partir da análise dos dados contidos na tabela 1 é possível identificar que as concentrações 0,5 ug/ml (grupo ARS1), 1 ug/ml (grupo ARS2) e 2 ug/ml (grupo ARS3) de artesunato utilizadas para este trabalho não foram suficientes para promover diferenças estatísticas ($p > 0,05$) nas taxas de maturação nuclear dos oócitos tratados após a MIV.

Tabela 1- Efeito do artesunato na taxa de maturação de oócitos

Grupos	Maturação % (% \pm SD)
Controle (-)	72.3 \pm 6.7
ARS 0.5 ug/ml	75.7 \pm 12.16
ARS 1 ug/ml	63.3 \pm 8.94
ARS 2 ug/ml	84.6 \pm 13.73

Logo, os oócitos corados com orceína acética para a visualização da maturação nuclear também não apresentaram diferenças significativas nos estádios de maturação. Indicando, portanto, que a droga antimalárica testada não interferiu no mecanismo de maturação nuclear destes oócitos. Esses resultados podem ser verificados por meio da análise das figuras abaixo.

Figura 1- Avaliação do estágio de maturação nuclear do grupo controle negativo (CT) após a MIV. As setas pretas indicam a presença do núcleo em metáfase em A) e B).

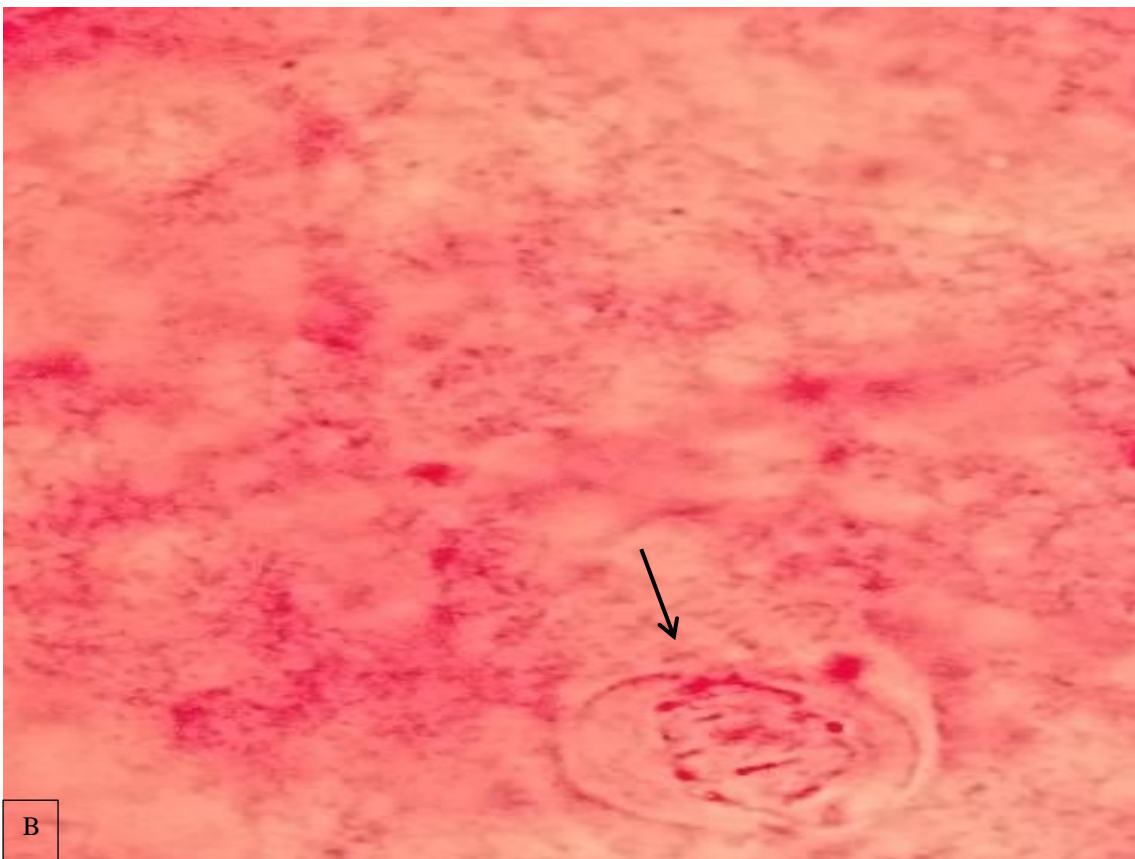
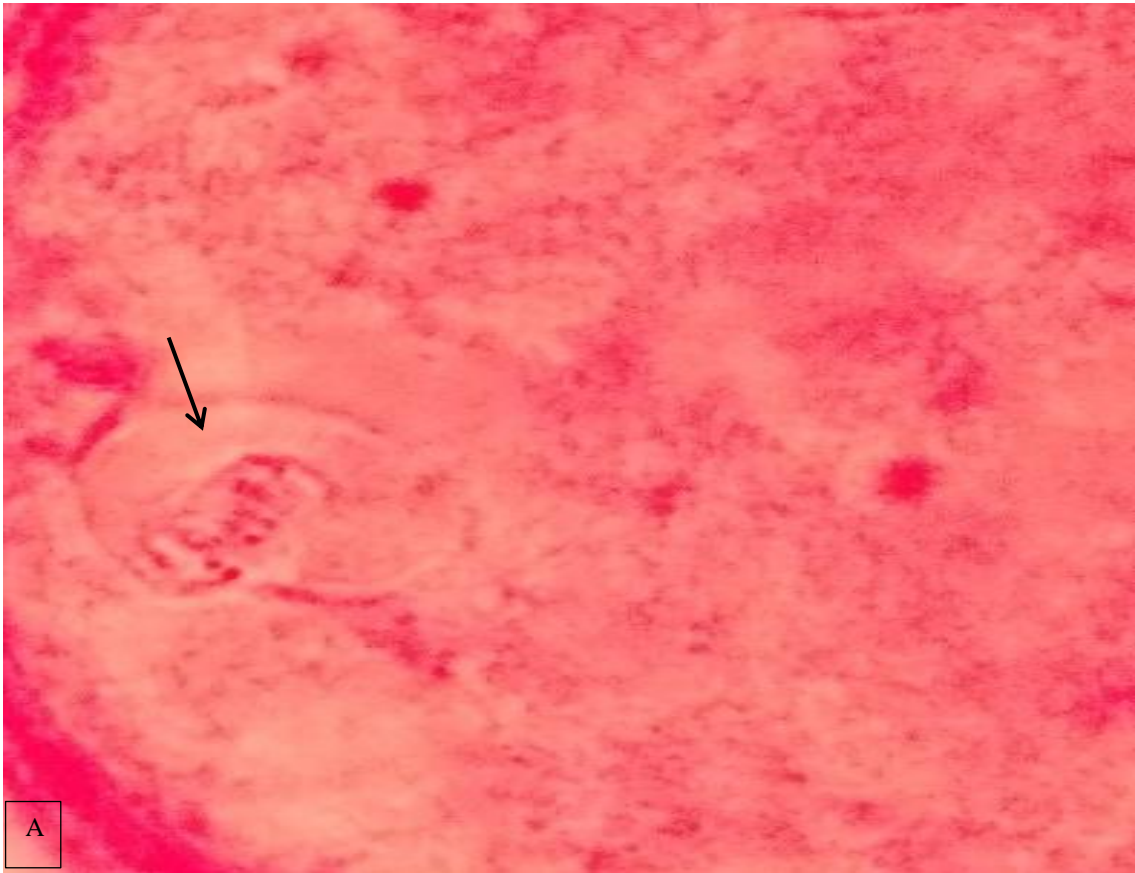


Figura 2- Avaliação do estágio de maturação nuclear do grupo ARS1 após a MIV. As setas pretas indicam o núcleo em A) metáfase (cromossomos alinhados na linha equatorial do fuso mitótico) e B) prófase.

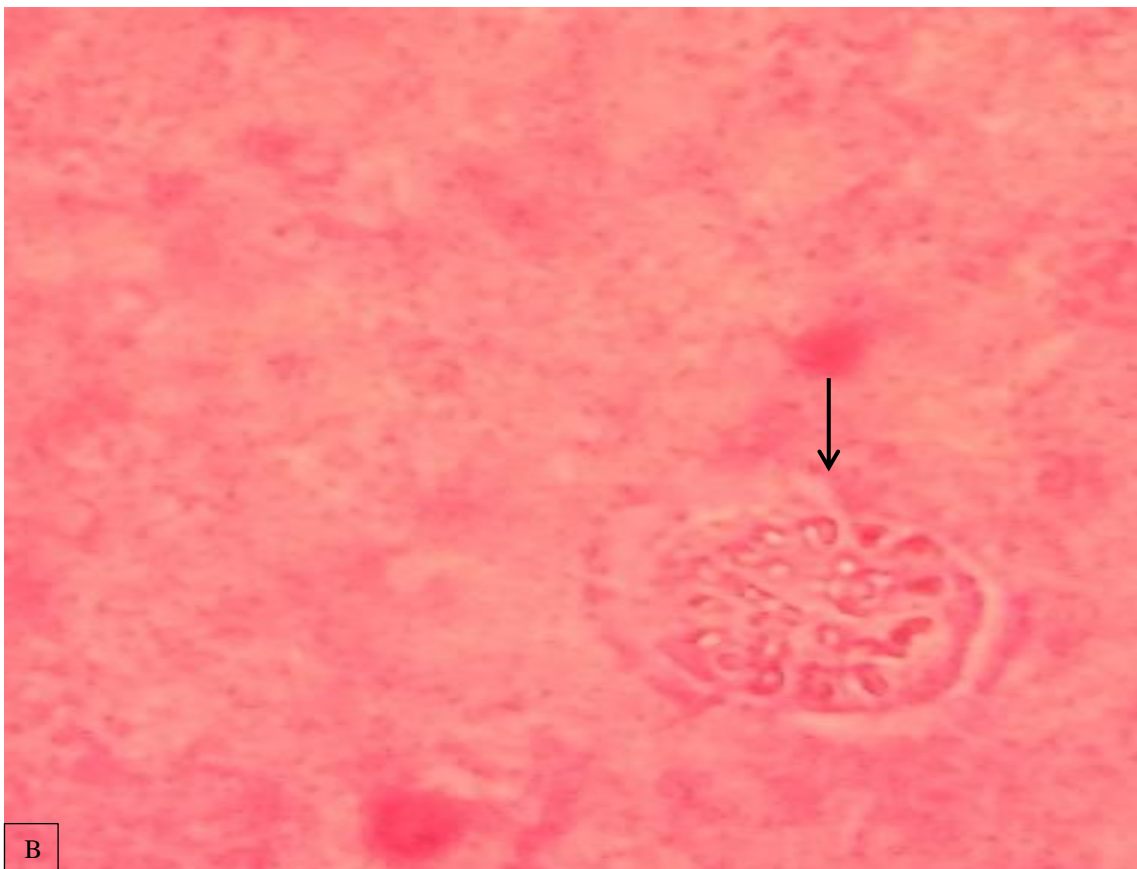
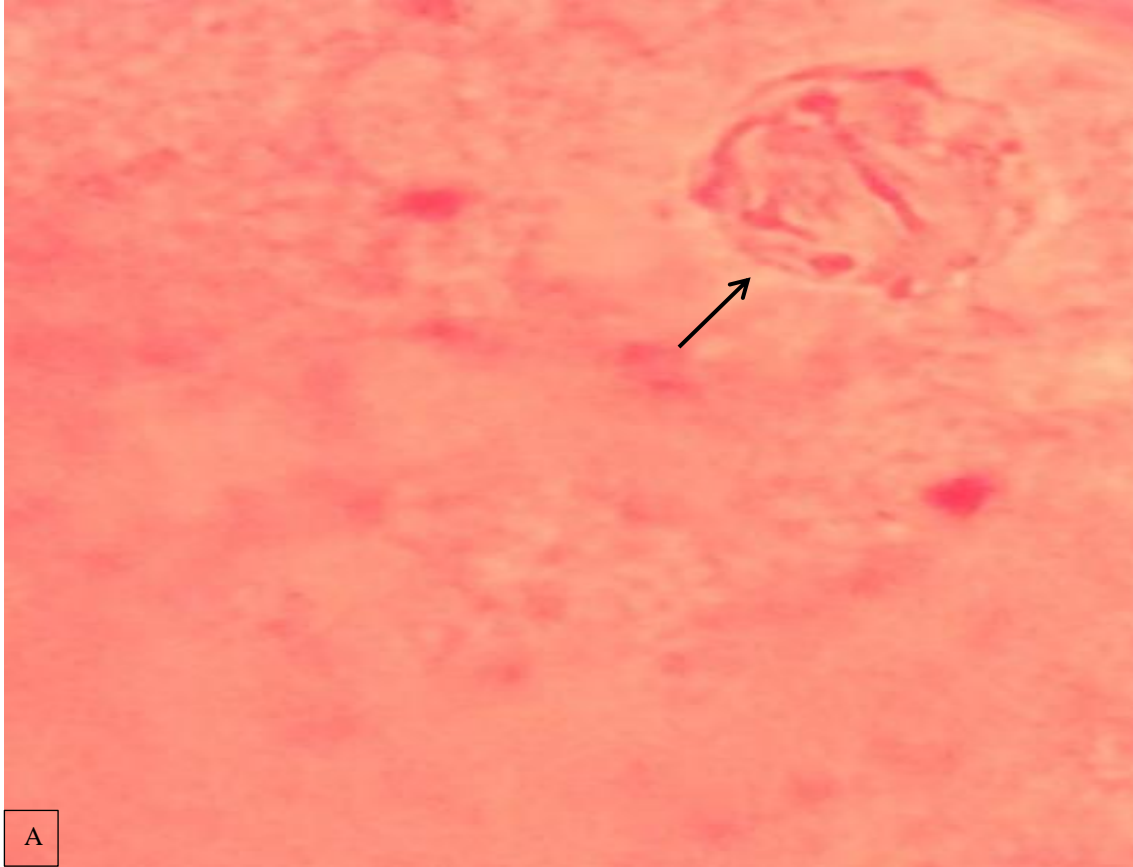


Figura 3- Avaliação do estágio de maturação nuclear do grupo ARS2 após a MIV. As setas pretas indicam o núcleo em A) anáfase e B) prófase.

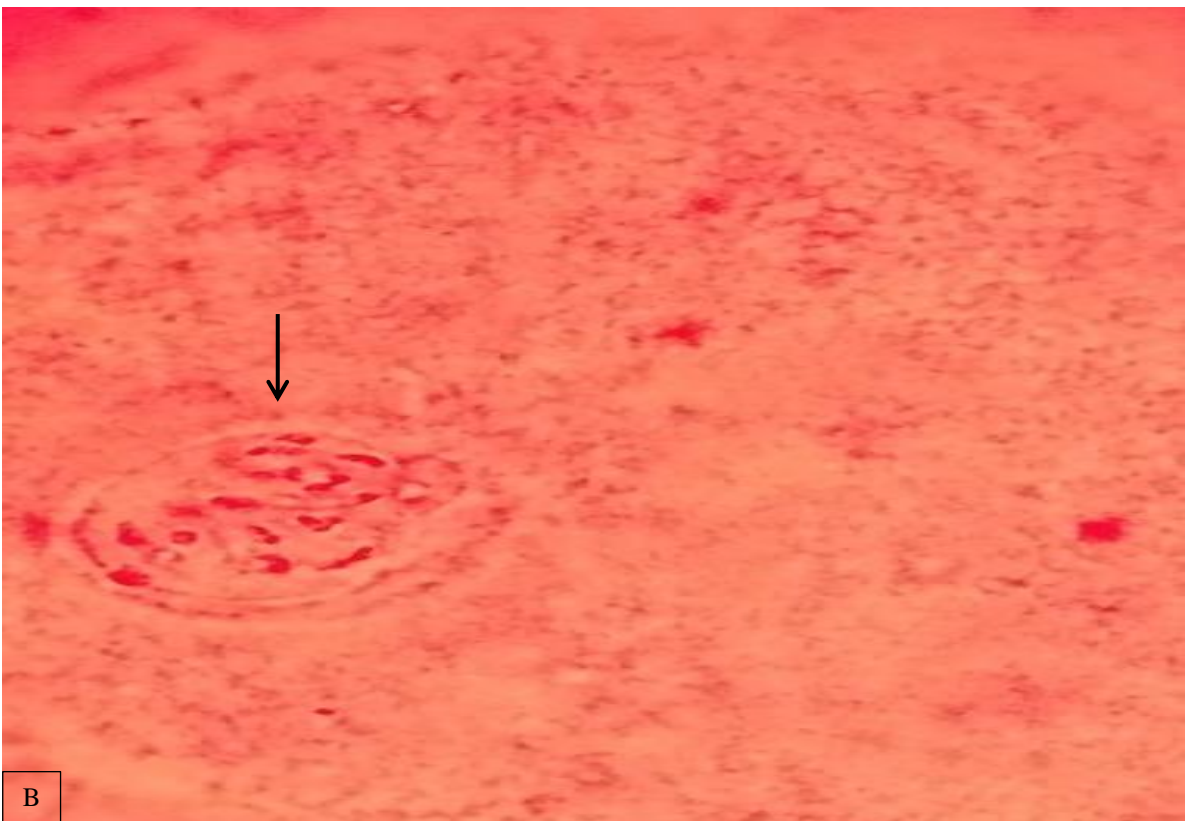
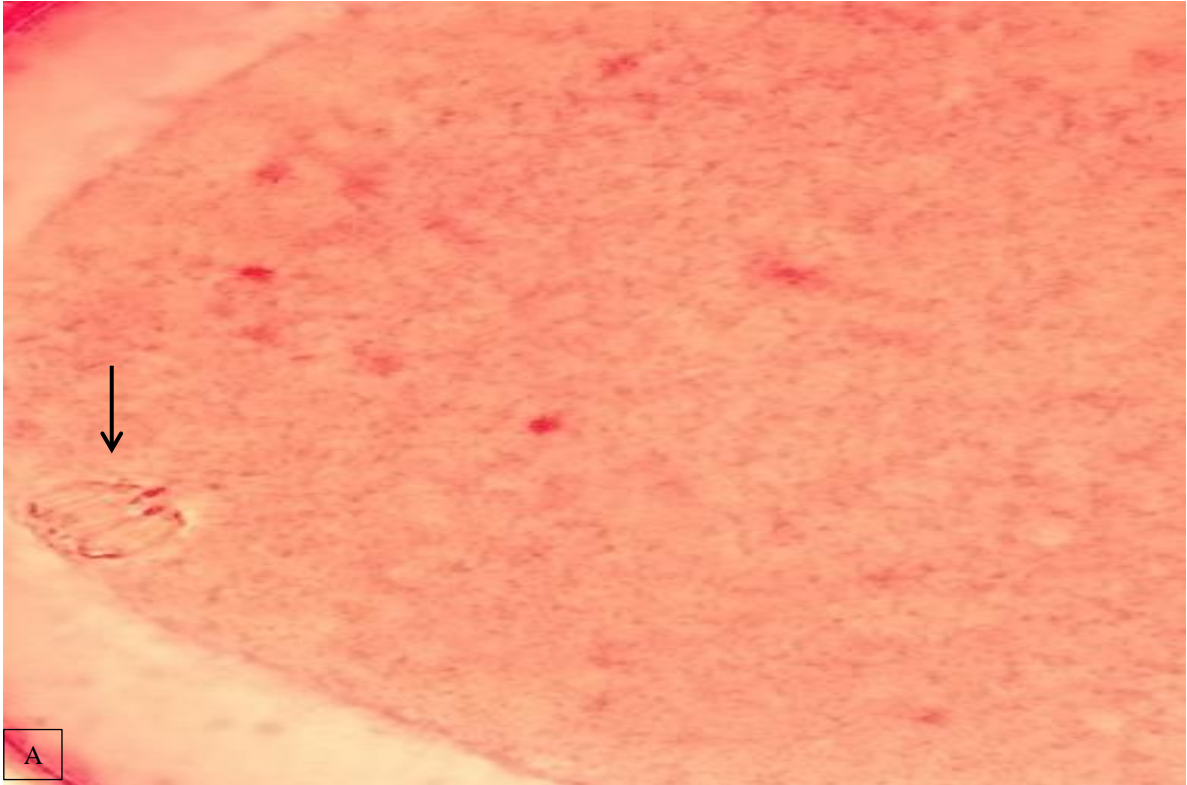
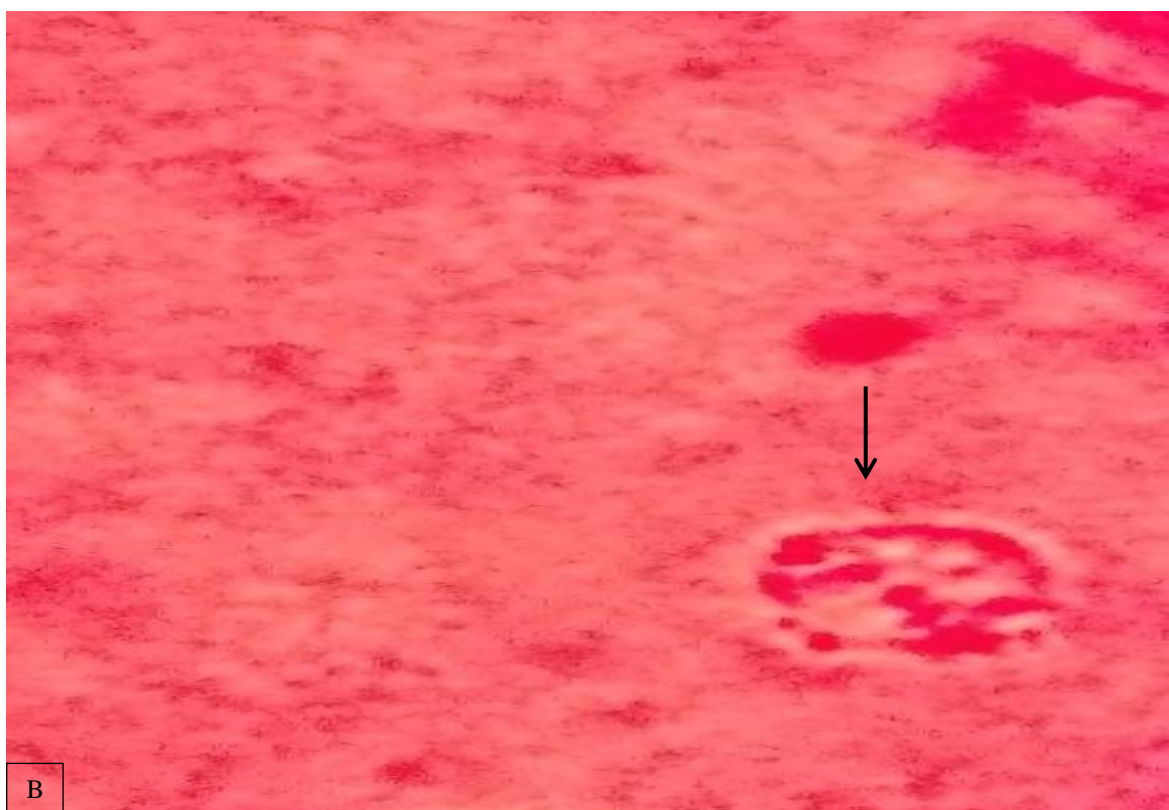
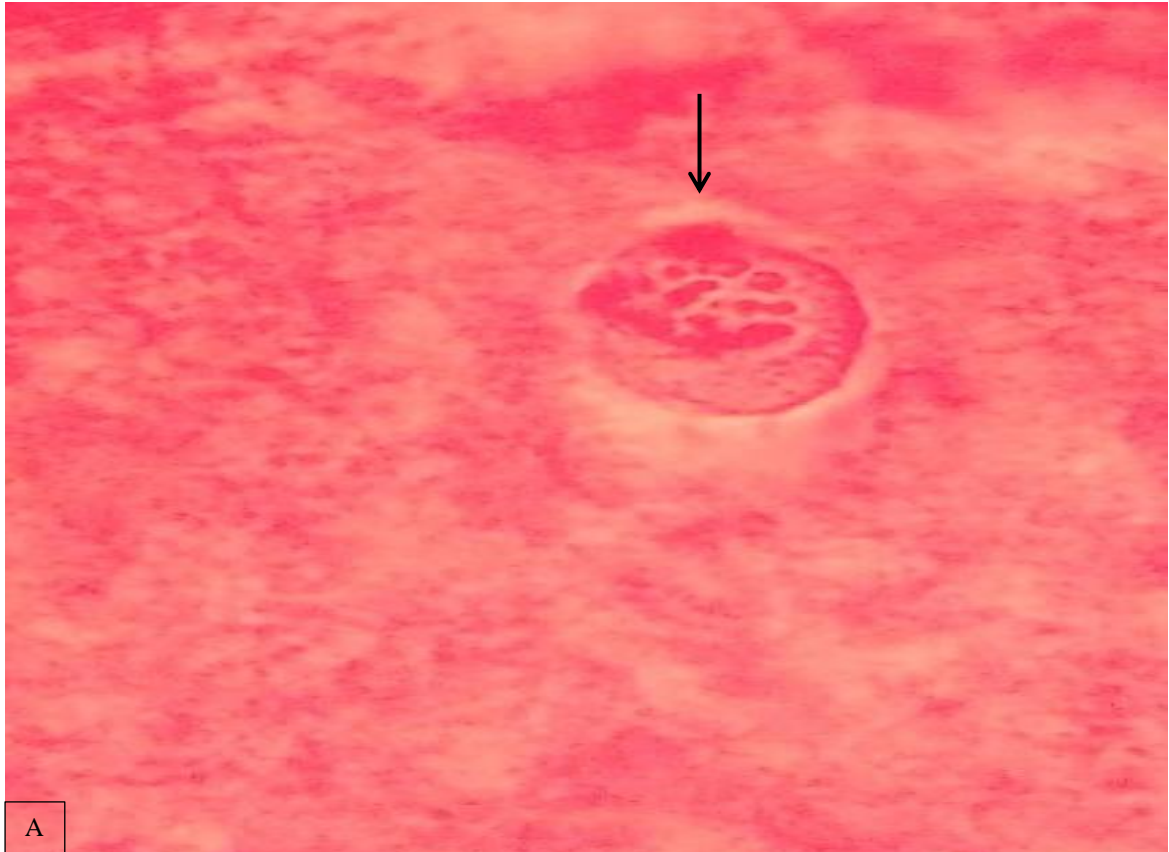


Figura 4 - Avaliação do estágio de maturação nuclear do grupo ARS3 após a MIV. As setas pretas indicam o núcleo em A) prófase e B) metáfase (cromossomos alinhados no fuso mitótico).



Análise da taxa de clivagens e blastocistos

Assim como para maturação, os resultados para as taxas de clivagens e blastocistos não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$), com relação aos grupos ARS1 (76.4% e 19.7%) ARS2 (79.2% e 19.5%) e ARS3 (74.9% e 23.2%) se comparado ao grupo controle, confirmando assim que o antimalárico ARS não interfere nesse processo. Isso pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2 - Efeito do artesunato sobre as taxas de clivagens e blastocistos.

Grupos	Clivagens % (% ± SD)	Blastocistos % (% ± SD)
Controle (-)	68.3 ± 20,05	28.7 ± 19.31
ARS 0.5 ug/ml	76.4 ± 11,03	19.7 ± 15.92
ARS 1 ug/ml	79.2 ± 10,53	19.5 ± 17.05
ARS 2 ug/ml	74.9 ± 16,91	23.2 ± 16.39

7. DISCUSSÃO

Este trabalho é pioneiro em relatar os efeitos da droga antimalárica artesunato sobre a maturação nuclear *in vitro* de oócitos bovinos, além de analisar as taxas de clivagens e blastocistos após o cultivo *in vitro*, com o propósito de investigar se essa droga possui efeito sobre o desenvolvimento embrionário inicial.

Para Aquino (2013), o ARS é dose-dependente e em concentrações de (7,5 ug/ml e 10 ug/ml) aumentam a incidência de quebras ao DNA, tendo assim um efeito genotóxico em células cultivadas *in vitro*. Portanto, isso evidencia que o artesunato possui toxicidade, porém o fato de termos usado dosagens pequenas (0,5 ug/ml, 1 ug/m e 2 ug/ml) pode ter influenciado nos resultados desse trabalho. Contudo, apesar de nossos resultados não apresentarem efeitos na maturação nuclear dos oócitos maturados *in vitro*.

A literatura apresenta resultados, os quais verificam que a ação do artesunato *in vitro* mesmo em baixas concentrações (5 mg/Kg) apresenta toxicidade em células de fígado de camundongos e *in vivo* a dosagem de (50 mg/Kg) teve efeito clastogênico nas células da

medula óssea do animal. Logo, é essencial o cuidado com os tratamentos prolongados com o uso da droga (AQUINO et al, 2011). De acordo com Li et al (2008), o artesunato induz a quebra da fita dupla de DNA, além de induzir danos oxidativos no DNA de células de glioblastoma humano.

A atividade citotóxica e genotóxica de medicamentos antimaláricos em geral vêm sendo estudada, porém apesar do artesunato ser utilizado como o principal tratamento para a malária causada por *P. falciparum*, os mecanismos de ação dessa droga em células cultivadas *in vitro* precisam ser mais bem esclarecidos, uma vez que há poucos trabalhos que abordam esse assunto (BOARETO et al, 2008).

A ação da artemisinina, bem como de seus derivados é por meio do componente endoperoxido presente em sua composição molecular, o qual na presença de ferro livre pode se transformar em um radical citotóxico, capaz de induzir danos oxidativos às células por meio da formação de radicais livres (SUNDAR, 2009). Contudo, apesar do ARS não apresentar diferenças estatísticas para a maturação nuclear, supõe-se que haja efeitos dessa droga sobre o mecanismo de maturação citoplasmática ou molecular, não investigadas nesse trabalho.

Investigamos também os efeitos do artesunato sobre a taxa de clivagens e formação de blastocistos. Nossos resultados demonstram por meio do teste (ANOVA) que não houve efeito significativo ($p > 0,05$) sobre as taxas de clivagens e blastocistos dos grupos que foram tratados com a droga antimalárica. Esses resultados são justificados pela baixa concentração utilizada nos tratamentos.

Portanto, nossos resultados corroboram com os trabalhos citados acima, os quais demonstram a citotoxicidade e genotoxicidade do artesunato em células de cultivo *in vitro*, porém em concentrações maiores as que foram utilizadas para este estudo.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluimos que, nas condições investigadas neste estudo, não houve diferença significativa com relação à maturação nuclear dos oócitos, assim como não influenciou nas taxas de clivagens e blastocistos. Logo o Artesunato não interfere no potencial de desenvolvimento embrionário inicial de oócitos bovinos maturados *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREOTI, M. **Produção in vitro de embriões: uso da glutatona durante o processo de lavagem e capacitação espermática.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural da Amazônia. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Belém, 2007.

ANGUITA, B; JIMENEZ, M. A. R; IZQUIERDO, D; MOGAS, T; PARAMIO, M. T. **Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepuberal goat oocytes.** Theriogenology, v.67, p.526-536, 2007.

AQUINO, I. **Efeito genotóxico da artemisinina e do Artesunato em células de mamíferos.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências. Botucatu, 2010.

AQUINO, I. et al. **Genotoxic evaluation of the antimalarial drugs artemisinina and artesunate in human HepG2 cell and effects on CASP3 and SOD1 gene expressions.** Genetics and Molecular Research, 12(3): p 2517-2527, 2013.

AQUINO, I; PERAZZO, F. F; MAISTRO, E. L. **Genotoxicity assessment of the antimalarial compound artesunate in somatic cells of mice.** Food. Chem. Toxicol. 49 (6). p 133-1339, 2011.

BARRONDO, M. del. C. **Influência de diferentes suplementos na maturação oocitária sobre o acúmulo de lipídeos citoplasmáticos em oócitos e embriões bovinos cultivados in vitro.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Agrária. UNESP, 2013.

BOARETO, A. C. et al. **Effects of the combined artesunate and mefloquine antimalarial drugs on rat embryos.** Human Experimental Toxicology. v. 32, p. 930-941, 2013

BOARETO, A. C. et al. **Study on the developmental toxicity of combined artesunate and mefloquine antimalarial drugs on rats.** Reproductive Toxicology. v.34, p 658-664, 2012.

BOARETO, A. C et al. **Toxicity of artemisinin (*Artemisia annua* L.) in two different periods of pregnancy in Wistar rats.** Reproductive Toxicology. v. 25, p. 239-246, 2008.

BOARETO, A. C. **Efeitos da artemisinina (*artemisia annua* l.) na gestação de ratas wistar.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Curitiba, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretária de Vigilância em Saúde.** Brasília, 2011. Disponível em <http://dw.gov.br>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011.** v. 44, nº1. 2013

CHAVES, R. N; DUARTE, A. B. G; MATOS, M. H. T; FIGUEIREDO, J. R. **Sistema de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócito imaturos de mamíferos.** Rev. Bras. Reprod. Anim. Belo Horizonte, v. 34, nº 1, p.37-49, 2010.

FAROMBI, E.O. **Genotoxicity of chloroquine in rat liver cells: Protective role of free radical scavengers.** Cell. Biol. Toxicol, 22: p. 159-167. 2006.

FERNANDEZ, A. E. et al. **Antimalarial chemotherapy: natural product inspired development of preclinical and clinical candidates with diverse mechanisms of action.** Journal of Medicinal Chemistry, 2016.

SUNDAR, S. N & FIRESTONE, G. L. **Anticancer activities of artemisinina and its bioactive derivates.** Exp Rev Mol Med. 11, 2009.

GONÇALVES, P. B. D; BARRETA, M. H; SANDRI, L. R; FERREIRA, R; ANTONIAZZI, A. Q. **Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte.** Rev. Bras. Reprod. Anim. Belo Horizonte, v. 31, n° 2, p.212-217, 2007.

GONÇALVES, P. B. D; FIGUEREDO, J. R; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal.** 2. Ed. São Paulo: Roca, 2008.

GOTTARDI, F. P, MINGOTI, G. Z. **Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento embrionário.** Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.40, n.2, p.43-50, abr./jun. 2016. Disponível em www.cbpa.org.br

GOU, Z. **Artemisinin anti-malarial drugs in China.** Acta Pharmaceutica Sinica B. v. 6, p. 115-124, 2016.

HOSHI, H. **In vitro production of bovine embryos and their application for embryotransfer.** Theriogenology, v.59, p.675-685, 2003.

KIM, B. K. et al. **Effects of spermatozoa during in vitro meiosis progression in the porcine germinal vesicle oocytes.** Anim Reprod Sci, v.104, p.83-92, 2008.

LI, P. C. H; LAM, E; ROOS, W; ZDZIENICKA, M. Z; KAINA, B & EFFERTH. **Artesunate derived from traditional Chinese medicine induces DNA damage and repair.** Cancer Res. 68 (11). p 4347- 4351, 2008.

LOU, X. E & ZHOU, H. J. **Effects of artesunate on progesterone estrogen content and decidua in rats.** Yao Xue Xue Bao. v. 4, p. 254-257, 2001.

MACHATY, Z; PEIPPO, J; PETER, S. **Production and manipulation of bovine embryo: techniques and terminology.** Theriogenology, v.78, p.937-950, 2012.

MARTINS, C. F; SIQUEIRA, L. G. B; DODE, M. A. N. **Biotecnologia Aplicada à pecuária bovina;** 2011.

MERTON, J. S; ROOS, A. P. W; MULLAART, E; RUIGH, L; KAAL, L; VOS, P. L. A. M; DIELEMAN, S. J. **Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry.** Theriogenology, v. 59, n. 2, p. 651-674, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Vigilância em Saúde.** Disponível em <http://dw.saude.gov.br>, acesso em: 28 de jun de 2015.

MIOTO, L. D; GALHARDI, L. C. F; AMARANTE, M. K. **Aspectos parasitológicos e imunológicos da malária.** Biosaúde. v. 14, n. 1, Londrina 2012.

MONTEIRO, M. R. C. C; RIBEIRO, M. C & FERNANDES, S. C. **Aspectos clínicos e epidemiológicos da malária em um hospital universitário de Belém, Estado do Pará, Brasil.** Rev. Pan-Amaz Saúde, 4(2): p. 33-43. Belém, 2013.

MOTA, T. C. **In vitro Evaluation of the Genotoxic and Cytotoxic Effects of Artesunate, an Antimalarial Drug, in Human Lymphocytes.** Environmental and Molecular Mutagenesis 52: p 590-594, 2011.

MOTA, T. C. **Caracterização In Vitro dos Efeitos Genotóxicos e Citotóxicos da Droga Antimalárica Artesunato em Linfócitos Humanos.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Pará. Belém, 2015.

OLIVEIRA, A. B; DOLABELA, M. F.; BRAGA, F.C.; JÁCOME, R. L. R. P; VAROTTI, F. P & POVOA. M. M **Plant-Derived Antimalarial Agents: New Leads and Efficient Phytochemicals.** Part I. Alkaloids, 2009.

PEREIRA, E. C. M; BORGES, A. M; OBA, E. **Maturação *in vitro* de oócitos bubalinos e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário.** Anim. Reprod Sci, v.40, p. 43-50, 2016. Disponível em www.cbpa.org.br

REVILLA, J. L. **Teste de toxicidade da fração da *auxemma oncocalicx* e *oncocaloixona A* sobre o desenvolvimento folicular e embrionário *in vitro*.** Tese de Doutorado. Programa de pós – graduação da Faculdade de Ciências Veterinárias. Fortaleza, 2016.

SARAIVA, N. Z. **Efeitos da Demecolcina na cinética de maturação, microtúbulos e na enucleação química de oócitos bovinos.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabau, 2006.

SOUZA, E. F. J. DE. **Modulação de efeitos estrogênicos induzidos pelo artesunato.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Curitiba, 2016.

WHO. World Health Organization. **Assessment of the safety of artemisinin compounds in pregnancy.** Geneva, 2003.

WHO. **Guidelines for the Treatment of Malaria. 3rd edition.** Geneva: World Health Organization. Available, 2015.

WHO. Library cataloguing-in publication Data; Word malária report: **I word health organization.** ISBN 9789241564694, 2013.

WMD. **End malaria for good 2016.** <http://www.worldmaliaday.org/>, 2016.