

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS- GENÉTICA E
BIOTECNOLOGIA

CAROLINA CAPOBIANGO ROMANO QUINTÃO

**ESTRATÉGIAS PARA REDUÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO E
ESTRESSE OXIDATIVO VISANDO OTIMIZAR O DESENVOLVIMENTO
PRÉ-IMPLANTACIONAL E A CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES
BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

TESE

Juiz de Fora

CAROLINA CAPOBIANGO ROMANO QUINTÃO

**ESTRATÉGIAS PARA REDUÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO E
ESTRESSE OXIDATIVO VISANDO OTIMIZAR O DESENVOLVIMENTO
PRÉ-IMPLANTACIONAL E A CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES
BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

Tese de Doutorado do Curso de Pós
Graduação em Ciências Biológicas para
obtenção do Título de Doutora em Ciências
Biológicas. Área: Genética e Biotecnologia

**Orientadora: Professora Dr^a Michele Munk Pereira
Coorientadora: Dr^a Naiara Zoccal Saraiva**

Juiz de Fora

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Capobiango Romano Quintão, Carolina.

Estratégias para redução do acúmulo lipídico e estresse oxidativo visando otimizar o desenvolvimento pré-implantacional e a criotolerância de embriões bovinos produzidos in vitro / Carolina Capobiango Romano Quintão. -- 2023.

158 f.

Orientadora: Michele Munk Pereira

Coorientadora: Naiara Zoccal Saraiva

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2023.

1. embriões bovinos. 2. criopreservação. 3. nanopartículas óxido de zinco. 4. acúmulo lipídico. 5. antioxidante. I. Munk Pereira, Michele , orient. II. Zoccal Saraiva, Naiara , coorient. III. Título.

CAROLINA CAPOBIANGO ROMANO QUINTÃO

**ESTRATÉGIAS PARA REDUÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO E DO ESTRESSE OXIDATIVO
VISANDO OTIMIZAR O DESENVOLVIMENTO PRÉ-IMPLANTACIONAL E A
CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

Tese apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em
Ciências Biológicas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Doutora em
Ciências Biológicas.
Área de
concentração:
Genética &
Biotecnologia.

Aprovada em 28 de setembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Michele Munk Pereira - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Dr^a. Naiara Zoccal Saraiva - Coorientadora

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Gado de Leite

Carlos Magno da Costa Maranduba

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Gado de Leite

Maitê del Collado Barrondo
Universidade de São Paulo - USP

Gisele Zoccal Mingoti
Universidade Estadual de São Paulo - UNESP

Juiz de Fora, 04/09/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Michele Munk Pereira, Professor(a)**, em 28/09/2023, às 15:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Naiara Zoccal Saraiva, Usuário Externo**, em 04/10/2023, às 09:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Sergio de Almeida Camargo, Usuário Externo**, em 04/10/2023, às 10:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Magno da Costa Maranduba, Professor(a)**, em 04/10/2023, às 10:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Zoccal Mingoti, Usuário Externo**, em 05/10/2023, às 10:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maite del Collado Barrondo, Usuário Externo**, em 05/10/2023, às 12:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1450497** e o código CRC **120FE1EB**.

**À minha mãe lêda, meu marido Daniel e minha filha Luísa
E às memórias do meu pai Marco e do meu filho Bernardo**

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da UFJF e seu corpo docente pelo aprendizado e oportunidade de participação.

À Embrapa Gado de Leite, por conceder a estrutura física e todo o suporte necessário à realização dos experimentos.

À minha orientadora Dra. Michele Munk pela oportunidade e confiança para que eu desenvolvesse esse trabalho sob sua orientação e por estar sempre solícita em todos os momentos.

À Dra Naiara Zoccal Saraiva, por dedicar seu tempo e seus saberes a mim. Por todas as trocas e discussões técnicas e pelo apoio na parte experimental e científica. Sua presença, ensinamentos e colaboração foram fundamentais para a realização desse trabalho.

À Dra Clara Slade Oliveira, sempre disposta a ajudar, não há palavras suficientes para agradecer.

Ao Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo, por apoiar a execução desse projeto e permitir que os experimentos fossem realizados no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite.

Ao Joel, por todas as coletas de ovários e por sua sempre boa vontade em colaborar com os experimentos do Laboratório.

Ao Myro e todos os estagiários e bolsistas do LRA que, de alguma forma, contribuíram para a execução desse trabalho.

Aos meus colegas e superiores, da Embrapa Gado de Leite, que apoiaram minha decisão em realizar o Doutorado, apesar das dificuldades que eu enfrentaria, por ter quer conciliá-lo com as minhas atividades profissionais.

À minha família, em especial, minha mãe, por sempre apoiar todas as minhas escolhas e por seu papel fundamental na minha realização pessoal e profissional. Ao meu marido Daniel e à minha filha Luísa, por entenderem minhas ausências e estarem sempre ao meu lado.

Aos presentes na banca, o meu sincero agradecimento.

À Deus, por amparar todas as minhas decisões e me conduzir sempre para as melhores escolhas.

***“Estou entre aqueles que acham que a
ciência tem uma grande beleza”***

Marie Curie

RESUMO

A expansão da indústria de embriões bovinos no Brasil, alavancada pela ampla adoção da biotécnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE), tem permitido ao Brasil uma posição de destaque. No entanto, apesar dos avanços já alcançados pela PIVE, um dos maiores desafios desta biotecnologia ainda é a baixa resistência dos embriões ao processo de criopreservação. Entre os fatores responsáveis, pelo alcance limitado dessa técnica, em diversas espécies de mamíferos, destaca-se o acúmulo lipídico embrionário. Além do acúmulo lipídico, outro fator que impacta a qualidade e sobrevivência dos embriões produzidos *in vitro* é a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO, naturalmente produzidas pelos embriões durante o estágio pré-implantacional, podem interagir com o excesso de lipídios embrionários, resultando na peroxidação lipídica, um fenômeno que está associado à danos funcionais e estruturais e, comprometimento da integridade e a permeabilidade da membrana celular embrionária, com impactos diretos nos resultados de sobrevivência à criopreservação. Assim, considerando a relevância da otimização das técnicas de produção *in vitro* e criopreservação de embriões bovinos em programas reprodutivos de raças leiteiras, especialmente aquelas adaptadas às condições tropicais, o objetivo deste trabalho foi propor algumas estratégias de suplementação na MIV, com foco em redução do conteúdo lipídico e estresse oxidativo visando obter embriões de melhor qualidade e melhores taxas de desenvolvimento pré implantacional e de criosobrevivência. No experimento 1, objetivou-se avaliar os efeitos de duas concentrações de L -carnitina (2,5 e 5mM), forskolina, 10 e 15 μ M e nanopartículas de óxido de zinco (NPZNOs) 1,0 e 1,5 μ g/mL no desenvolvimento, acúmulo lipídico e número de células totais dos blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. No experimento 2, foi selecionada 1 concentração de cada substância (com base nos resultados do experimento 1) a fim de avaliar seus efeitos na criosobrevivência, atividade mitocondrial e produção de ERO, de embriões bovinos. Os resultados do experimento 1 mostraram que não houve uma diferença significativa ($p>0,05$) nas taxas de clivagem embrionária entre os grupos de forskolina e o controle, mas o controle apresentou diferença ($p<0,05$) na taxa de desenvolvimento no D7(59,2%) em relação aos grupos forskolina 10 μ M (42,1%) e 15 μ M (37,9%). As taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário não mostraram diferenças significativas ($p>0,05$) entre

o controle e os grupos tratados com L-carnitina e NPZNOs. Foi observada uma redução significativa ($p < 0,05$) no acúmulo lipídico nos tratamentos forscolina 10 μ M e L-carnitina 2,5mM em comparação com o controle. Em relação ao número total de células, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) dos embriões tratados com forscolina 15 μ M e NPZNOs 1,0 μ g/mL em comparação ao controle. No Experimento 2, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nas taxas de criosobrevivência, 48h após o reaquecimento, e na atividade mitocondrial entre os grupos. No entanto, todos os tratamentos resultaram em uma menor produção de ERO ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle. Em conjunto, os dados desse estudo forneceram novas informações sobre aspectos importantes do metabolismo de embriões bovinos, antes e após a vitrificação. As NPZNOs, ainda pouco exploradas na área da reprodução apresentam-se como moléculas promissoras no desenvolvimento embrionário *in vitro* e na melhoria das taxas de criopreservação, principalmente, devido ao seu potencial antioxidante. Abrem-se assim, novas possibilidades de utilização dessas moléculas, no incremento das taxas de desenvolvimento de embriões em estágio pre-implantacional.

Palavras chave: acúmulo lipídico, espécie reativas de oxigênio, reguladores metabólicos, criosobrevivência, nanopartículas óxido de zinco

ABSTRACT

The expansion of the Brazilian cattle embryo industry, driven by the widespread adoption of *in vitro* embryo production (IVEP) biotechnology, has positioned Brazil prominently in this field. However, despite the advances achieved in IVEP, one of the major challenges of this biotechnology remains the low resistance of embryos to the cryopreservation process. Among the factors responsible for the limited success of this technique in various mammalian species, embryonic lipid accumulation stands out. In addition to lipid accumulation, another factor impacting the quality and survival of *in vitro*-produced embryos is the excessive production of reactive oxygen species (ROS). ROS, naturally produced by embryos during the pre-implantation stage, can interact with the excess embryonic lipids, leading to lipid peroxidation, a phenomenon associated with functional and structural damage, compromising the integrity and permeability of the embryonic cell membrane, with direct impacts on cryopreservation survival outcomes. Thus, considering the relevance of optimizing *in vitro* production and cryopreservation techniques of bovine embryos in reproductive programs of dairy breeds, especially those adapted to tropical conditions, the objective of this study was to propose some supplementation strategies in IVM, focusing on reducing lipid content and oxidative stress to obtain higher quality embryos and improved rates of pre-implantation development and cryosurvival. In Experiment 1, the effects of two concentrations of L-carnitine (2.5 and 5 mM), forskolin (10 and 15 μ M), and zinc oxide nanoparticles (NPZNOs) (1.0 and 1.5 μ g/mL) on the development, lipid accumulation, and total cell number of *in vitro*-produced bovine blastocysts were evaluated. In Experiment 2, one concentration of each substance (based on the results of Experiment 1) was selected to assess their effects on cryosurvival, mitochondrial activity, and ROS production of bovine embryos. The results of Experiment 1 showed that there was no significant difference ($p>0.05$) in embryo cleavage rates between the forskolin groups and the control, but the control showed a difference ($p<0.05$) in the development rate on Day 7 (59.2%) compared to the forskolin 10 μ M (42.1%) and 15 μ M (37.9%) groups. Cleavage and embryonic development rates did not show significant differences ($p>0.05$) between the control and the groups treated with L-carnitine and NPZNOs. A significant reduction ($p<0.05$) in lipid accumulation was observed in the forskolin 10 μ M and L-carnitine 2.5 mM treatments compared to the

control. Regarding the total cell number, there was a significant increase ($p < 0.05$) in embryos treated with forskolin 15 μM and NPZNOs 1.0 $\mu\text{g/mL}$ compared to the control. In Experiment 2, no significant differences ($p > 0.05$) were observed in cryosurvival rates 48 hours after rewarming and in mitochondrial activity between the groups. However, all treatments resulted in lower ROS production ($p < 0.05$) compared to the control group. Collectively, the data from this study provided new insights into important aspects of bovine embryo metabolism, before and after vitrification. NPZNOs, still relatively unexplored in the field of reproduction, emerge as promising molecules *in vitro* embryonic development and improving cryopreservation rates, mainly due to their antioxidant potential. Thus, new possibilities for the use of these molecules in enhancing the development rates of pre-implantation stage embryos are opening up.

Keywords: lipid accumulation, reactive oxygen species, metabolic regulators, cryosurvival, zinc oxide nanoparticles

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática dos passos da fertilização <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> em mamíferos	25
Figura 2 -	Vias metabólicas essenciais para o desenvolvimento embrionário bovino	29
Figura 3 -	Mecanismos da biossíntese de lipídios.....	32
Figura 4 -	Membrana plasmática com diferentes níveis de fluidez devido à composição de ácidos graxos	34
Figura 5 -	Hidrólise de triglicerídeos	36
Figura 6 -	Fatores envolvidos no sucesso da criopreservação	57
Figura 7 -	Presença da Nanotecnologia em diversos setores da economia.....	60
Figura 8 -	Apresentação esquemática da reação em cadeia da peroxidação lipídica mediada por ERO (ROS)	66
Figura 9 -	O papel das mitocôndrias no metabolismo celular, vias de sinalização e expressão gênica	69
Figura 10 -	Fatores endógenos e exógenos que contribuem para a formação de ERO durante o cultivo embrionário <i>in vitro</i>	71
Figura 11 -	Efeito das espécies reativas de oxigênio nas células embrionárias.....	73
Figura 12 -	Representação esquemática do delineamento do experimento do capítulo 1.....	105
Figura 13 -	Equipamento e cubetas utilizados na técnica de Espalhamento Dinâmico da Luz e potencial zeta	107
Figura 14 -	Imagem de um sonicador, equipamento usado para dispersão das nanopartículas em meio líquido	107
Figura 15 -	Imagens de nanopartículas de óxido de zinco (NPZNOs) por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em diferentes escalas	111
Figura 16 -	Resultado do potencial zeta nas concentrações de 1,5µg/mL(a), e 100µg/mL (b).....	113
Figura 17 -	Suplementação com forskolina durante a maturação <i>in vitro</i> : efeitos nos níveis de lipídios de blastocistos bovinos.....	115
Figura 18 -	Suplementação com L- carnitina durante a maturação <i>in vitro</i> : efeitos nos níveis de lipídios dos blastocistos bovinos	116

Figura 19 - Suplementação com NPZNOs durante a maturação <i>in vitro</i> : efeitos nos níveis de lipídios dos blastocistos bovinos	116
Figura 20 - Efeito da forskolina no número total de células de blastocistos bovinos	117
Figura 21 - Efeito da L-carnitina no número total de células de blastocistos bovinos	117
Figura 22 - Efeito das NPZNOs no número total de células de blastocistos bovinos	117
Figura 23 - Representação esquemática do delineamento do experimento do capítulo 2.....	136
Figura 24 - Atividade mitocondrial em embriões bovinos vitrificados, após 48h de reaquecimento. O gráfico e as imagens mostram as intensidades de fluorescência da sonda Mitotracker Red CMX ROS, após exposição dos embriões bovinos aos diferentes tratamentos. O software ImageJ foi utilizado para quantificar as estruturas, a partir da intensidade de fluorescência após a conversão da imagem para 8 bits e a delimitação do citoplasma. As imagens foram capturadas na objetiva de 20x.....	142
Figura 25 - Imagens representativas de blastocistos bovinos corados para níveis intracelulares de EROS (espécies reativas de oxigênio). O gráfico e as imagens mostram as intensidades de fluorescência de blastocistos bovinos vitrificados, corados com a sonda CellRox Green, após 48h de descongelamento. Letras diferentes no gráfico indicam diferença significativa ($p < 0,05$).....	143
Figura 26- Imagens de embriões bovinos 48h após o reaquecimento, demonstrando a atividade mitocondrial (Mitotracker Red CMX Ros) e a produção de radicais livres (Cell Rox Green) nos diferentes tratamentos adicionados na MIV	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados de NPZNOs no meio MIV obtidos pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS - Dynamic Light Scattering)	112
Tabela 2 - Taxas de clivagem e formação de blastocistos após maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos em meio suplementado com forskolina nas seguintes concentrações: 0 (controle), 10 μ M e 15 μ M.....	114
Tabela 3 - Taxas de clivagem e formação de blastocistos após a maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos em meio suplementado com L-carnitina nas seguintes concentrações: 0 (controle), 2,5mM e 5mM.....	114
Tabela 4 - Taxas de clivagem e formação de blastocistos após a maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos em meio suplementado com nanopartículas de óxido de zinco nas seguintes concentrações: 0 (controle), 1,0 μ g/mL e 1,5 μ g/mL	115
Tabela 5- Re-expansão entre os grupos de blastocistos tratados com L-carnitina 2.5mM, forskolina 10 μ M e NPZNOs 1,0 μ g/mL na MIV, após vitrificação, aquecimento e cultivo por 2,24 e 48h.....	141
Tabela 6- Eclosão entre os grupos de blastocistos tratados com L-carnitina 2.5mM, forskolina 10 μ M e NPZ.NO 1,0 μ g/mL na MIV, após vitrificação, aquecimento e cultivo por 2, 24 e 48h	142

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil Coenzima A
ADP	Adenosina Difosfato
AG	Ácido Graxo
AGL	Ácido Graxo Livre
AGPI	Ácido Graxo Poliinsaturado
AMPc	Adenosina Monofosfato-Cíclico
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Bovine Serum Albumin “Albumina Sérica Bovina”
CAT	Catalase
CC	Células do Cúmulus
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
COC	Cumulus Oocyte Complex “Complexo Cúmulus-Oócito”
CLA	Conjugated Linoleic Acid “Ácido Linoléico Conjugado”
CPT	Carnitina Palmitoil Transferase
DGAT2	Diacilglicerol aciltransferase 2
DHA	Ácido docosahexaenóico
DLS	Dynamic Light Scattering “Espalhamento da Luz Dinâmica”
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Éster de Colesterol
EDS	Espectroscopia de Dispersão de Energia
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FAO	Food and Agriculture Organization “Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura”
FABP	Fatty Acid Binding Proteins “Proteínas Ligadoras de Ácidos Graxos”
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona Oxidada
IETS	International Embryo Techonology Society
IGF	Insulin-like Growth Factor
LH	Hormônio Luteinizante
LMSD	Lipid Maps Structure Database

MDA	Malondialdeído
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MPF	Maturation Promoting Factor “Fator Promotor de Maturação”
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
NP	Nanopartícula
NPZNOs	Nanopartícula de Óxido de Zinco
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development “Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico”
OPU	Ovum Pick-Up
PC	Foscolinas
PDI	Index Polidispersity “Índice de Polidispersão”
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PK	Proteína quinase
POD	Peroxidase
PLIN	Perilipin
RNAm	RNA mensageiro
Se	Selênio
SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	Synthetic Oviductal Fluid “Fluido sintético de Oviduto”
TALP	Tyrode-albumina-lactato-piruvato
TCM	Tissue Medium Culture “Meio de Cultivo Tecido”
TE	Transferência de embrião
TG	Triglicerídeo
TIP47	Tail-interacting protein of 47 kDa
Zn	Zinco
ZnO	Óxido de Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	19
1.1	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	21
1.1.1	Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	23
1.1.2	Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	24
1.1.3	Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	26
1.2.	METABOLISMO ENERGÉTICO EMBRIONÁRIO	26
1.3	ÁCIDOS GRAXOS NA PIVE	29
1.3.1	Definição e importância fisiológica dos ácidos graxos	33
1.3.2	Biossíntese e armazenamento de ácidos graxos	35
1.3.3	Metabolismo lipídico durante a maturação oocitária	37
1.3.4	Importância dos ácidos graxos durante o desenvolvimento pré-implantacional de embriões bovinos	40
1.4	ESTRATÉGIAS PARA REDUÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO EMBRIONÁRIO	42
1.4.1	O uso de reguladores metabólicos no desenvolvimento de embriões bovinos <i>in vitro</i>	44
1.4.1.1	Carnitina	44
1.4.1.2	Forscolina	47
1.5	CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS	49
1.5.1	Crioprotetores	50
1.5.2	Métodos de criopreservação	52
1.5.3	Fatores que afetam a criotolerância de embriões bovinos	54
1.5.4	Diferentes abordagens para otimizar a criotolerância de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i>	57
1.6	NANOBIOTECNOLOGIA	59
1.6.1	Nanopartículas de óxido de zinco (NPZNOs)	60
1.6.2	NPZNOs no desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	63
1.6.3	Atividade antioxidante de NPZNOs	65

1.7	IMPORTÂNCIA DAS MITOCÔNDRIAS NO METABOLISMO EMBRIONÁRIO...	67
1.8	ESTRESSE OXIDATIVO	70
1.8.1	Condições de cultivo <i>in vitro</i> e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	70
1.8.2	Papel das espécies reativas de oxigênio no desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	72
1.9	OBJETIVO GERAL.....	74
1.10	REFERÊNCIAS	75
2	CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO E QUALIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS APÓS O USO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE L-CARNITINA, FORSCOLINA, E NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO NA MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>.....	100
2.1	INTRODUÇÃO.....	100
2.2	OBJETIVOS	103
2.2.1	Objetivo Geral	103
2.2.2	Objetivos Específicos	103
2.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	104
2.3.1	Local dos experimentos	104
2.3.2	Meios de cultivo e reagentes.....	104
2.3.3	Delineamento experimental.....	104
2.3.4	Síntese das nanopartículas de óxido de zinco (NPZNOs).....	105
2.3.5	Caracterização das NPZNOs	106
2.3.5.1	Análise por microscopia eletrônica de varredura.....	106
2.3.5.2	Análise de tamanho e potencial zeta por espalhamento dinâmico da luz (DLS)	106
2.3.6	Seleção e maturação <i>in vitro</i> dos oócitos	107
2.3.7	Fertilização e cultivo <i>in vitro</i> de embriões.....	108
2.3.8	Ensaio do acúmulo lipídico e determinação do número de células totais	109
2.3.9	Análise estatística.....	110

2.4	RESULTADOS.....	111
2.4.1	Caracterização das NPZNOs	111
2.4.2	Efeitos das diferentes concentrações dos reguladores metabólicos e NPZNOs nas taxas de clivagem e de blastocisto	114
2.4.3	Efeitos das diferentes concentrações dos reguladores metabólicos e NPZNOs no acúmulo lipídico e número de células totais	115
2.5	DISCUSSÃO	118
2.6	CONCLUSÕES	125
2.7	REFERÊNCIAS	126
3	CAPÍTULO 2: EFEITOS DOS REGULADORES METABÓLICOS E NPZNOs NA CRIOSOBREVIVÊNCIA, ATIVIDADE MITOCONDRIAL E NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	131
3.1	INTRODUÇÃO.....	131
3.2	OBJETIVOS	135
3.2.1	Objetivo geral.....	135
3.2.2	Objetivos específicos	135
3.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	136
3.3.1	Delineamento experimental.....	136
3.3.2	Seleção e maturação <i>in vitro</i> dos oócitos	137
3.3.3	Produção <i>in vitro</i> dos embriões.....	137
3.3.4	Vitrificação e descongelamento dos embriões	138
3.3.5	Detecção de atividade mitocondrial e níveis de espécies reativas de oxigênio.....	139
3.3.6	Análise estatística	140
3.4	RESULTADOS.....	141
3.4.1	Efeitos dos reguladores metabólicos e NPZNOs na sobrevivência embrionária após a vitrificação.....	141
3.4.2	Efeitos dos reguladores metabólicos e NPZNOs na atividade mitocondrial de embriões bovinos após o descongelamento e cultivo por 48h.....	142

3.4.3	Efeitos dos reguladores metabólicos e NPZNOs nos níveis de ERO em embriões bovinos após o descongelamento e cultivo por 48h.....	143
3.5	DISCUSSÃO	145
3.6	CONCLUSÃO.....	151
3.7	REFERÊNCIAS	152
3.8	PERSPECTIVAS.....	158

1 INTRODUÇÃO GERAL

A indústria de laticínios destaca-se como líder no setor de alimentos no que tange à incorporação de tecnologias avançadas em animais (Wiggans *et al.*, 2017), desempenhando um papel essencial no cenário socioeconômico global. Embora o crescimento da produção mundial de leite tenha sido limitado nos últimos anos, projeta-se um aumento de 22% em 2027 em comparação à 2015-2017 (OECD; FAO, 2018).

No Brasil, a demanda por produtos lácteos tem apresentado um aumento significativo em comparação ao crescimento demográfico, o que destaca a importância da indústria do leite no país (Perobelli *et al.*, 2018).

A expansão da indústria de embriões bovinos no Brasil, alavancada pela ampla adoção da biotécnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE) a partir dos anos 2000, tem permitido ao Brasil uma posição de destaque. Segundo dados recentes (Viana, 2022), foi observado um aumento notável no número de embriões produzidos *in vitro* em 2021 (1.521.018 em comparação com 1.156.422 em 2020; +31,5%), o que resultou em um aumento de 25,6% no total mundial, o maior desde 2003. As tendências observadas para embriões produzidos *in vitro* em 2021 foram principalmente impulsionadas pelo cenário nas Américas. A América do Norte e América do Sul responderam por 95,7% dos embriões produzidos *in vitro* e, em ambas as regiões, os números aumentaram de maneira semelhante (+32,1% e +35,3%, respectivamente, em comparação com 2020)."

No ano de 2017, pela primeira vez, o número de embriões produzidos e transferidos *in vitro* foi significativamente maior que o número desenvolvido *in vivo* em todo o mundo (Sanches *et al.*, 2019).

Visando alavancar ainda mais o setor, as principais pesquisas na área de biotecnologia da reprodução concentram-se nas análises genômicas visando a seleção de embriões e animais com características desejáveis, otimização dos meios de cultivo e melhorias das técnicas de criopreservação de embriões (Sanches *et al.*, 2019).

No entanto, apesar dos avanços já alcançados pela PIVE, um dos maiores desafios desta biotecnologia ainda é a baixa resistência dos embriões ao processo de criopreservação (Vajta; Kuwayama; 2006; Sudano *et al.*, 2011; Zolini *et al.*, 2019). Entre os fatores responsáveis pelo alcance limitado dessa técnica em diversas espécies de mamíferos, destaca-se o acúmulo lipídico embrionário (Dobrinsky, 2001; Romao *et al.*, 2015; De Camargo *et al.*, 2022).

Segundo Sudano *et al.* (2016), a alteração do perfil lipídico da membrana é observada no estágio de 8 a 16 células, podendo estar relacionada à aquisição de moléculas reguladoras do metabolismo da gordura, após ativação do genoma embrionário. Isso, por sua vez, resulta em variações no perfil lipídico na mórula e no blastocisto.

Assim, baseado nessa característica fisiológica, a maioria das pesquisas que tentam modular o metabolismo lipídico no embrião, concentra estratégias na etapa do cultivo *in vitro* (CIV) (Sudano *et al.*, 2016). Tal escolha se deve ao fato de que é a partir dessa fase que ocorre aumento do metabolismo e, conseqüentemente, maior formação de gotículas lipídicas. No entanto, outros estudos tem demonstrado que o acúmulo lipídico começa desde a remoção do oócito de seu ambiente original e que o conteúdo lipídico desses oócitos, desde a fase de maturação, também exerce impacto sobre a qualidade embrionária (Del Collado *et al.*, 2017).

Além do acúmulo lipídico, outro fator que impacta a qualidade e sobrevivência dos embriões produzidos *in vitro* é a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) Estes são naturalmente produzidos pelos embriões durante o estágio pré-implantacional, como resultado de alterações metabólicas essenciais ao desenvolvimento (Hajian *et al.*, 2017). A problemática emerge quando ocorre uma produção excessiva de ERO, atribuída, em parte, pelas próprias condições do cultivo *in vitro*, como luz, pH, temperatura e meio de cultura (Sanches, *et al.*, 2017; Deluao *et al.*, 2022). O excesso de ERO pode resultar no estresse oxidativo (Guerin *et al.*, 2001; Bedaiwy *et al.*, 2004), devido à oxidação de lipídios, ácidos nucleicos e outras macromoléculas, que pode levar à mortalidade embrionária (Torres- Osorio, *et al.*, 2019; Deluao, *et al.*, 2022).

Vale ressaltar que, os radicais livres podem interagir com o excesso de lipídios embrionários, resultando na peroxidação lipídica, um fenômeno que está associado a danos funcionais e estruturais nos embriões. Esse processo pode comprometer a

integridade e a permeabilidade da membrana celular (Isaac *et al.*, 2017) com impacto direto nos resultados de sobrevivência à criopreservação.

Assim, considerando a relevância da otimização das técnicas de produção *in vitro* e criopreservação de embriões bovinos em programas reprodutivos de raças leiteiras, especialmente aquelas adaptadas às condições tropicais, o objetivo deste trabalho foi avaliar como diferentes concentrações dos reguladores metabólicos, L-canitina e forscolina, juntamente com nanopartículas de óxido de zinco (NPZNOs), durante a etapa de MIV, influenciam em diversos aspectos importantes para o desenvolvimento pré-implantacional, como taxas de desenvolvimento embrionário e, acúmulo lipídico, além de parâmetros avaliados após a vitrificação, como sobrevivência pós-criopreservação, atividade mitocondrial e produção de radicais livres de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

1.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Há aproximadamente 40 anos, desde o registro do primeiro bovino nascido a partir de um embrião gerado em laboratório (Brackett *et al.*, 1981), têm ocorrido avanços notáveis na área de reprodução animal, impulsionados pelo progresso científico e tecnológico. As técnicas de produção de embriões em ambiente controlado, associadas ao uso de sêmen selecionado por sexo e à genômica de seleção (Johnson, 1995), têm sido amplamente adotadas em diferentes regiões do mundo, incluindo América do Norte, América do Sul e Europa (Gallego *et al.*, 2022).

A associação dessas tecnologias oferece várias vantagens, como a produção de mais embriões e gestações por unidade de tempo, a possibilidade de coletar oócitos de fêmeas com alto mérito genético, uma maior eficiência no uso do sêmen sexado, por meio do aproveitamento de uma dose reduzida de sêmen, devido à necessidade de menos espermatozoides para produzir embriões. Isso ocorre porque o processo de separação dos espermatozoides pode comprometer a eficiência de fertilização de uma parte deles, mas, em condições de fecundação *in vitro*, há uma demanda menor por esses gametas (Morotti *et al.*, 2014).

O Brasil ocupa posição de destaque na produção de embriões *in vitro*, conforme o ranking mundial de embriões produzidos (Viana, 2018). Essa posição é favorecida

pela predominância de raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) em nosso país, altamente adaptadas às condições tropicais. No entanto, a taxa média de produção de embriões a partir do total de complexos cumulus oócitos (COCs) ainda fica em torno de 30 a 40% (Lonergan *et al.*, 2016), o que é bastante semelhante à taxa observada no período entre 1990 e 2000, quando se atingiu um platô (Sirard, 2018). De acordo com dados da International Embryo Technology Society (IETS), o número de embriões produzidos *in vitro* tem apresentado aumento constante desde 2012, com uma taxa média de crescimento anual de 15,8% (Viana, 2018). De acordo com dados de 2019, cerca de 72% dos embriões produzidos no mundo eram embriões PIV (Valente *et al.*, 2022).

Estudos nessa área têm contribuído para melhorar a eficiência e a qualidade dos embriões produzidos *in vitro*, ao explorar novas abordagens na maturação oocitária, fertilização, desenvolvimento embrionário e nas técnicas de criopreservação (Choudhary *et al.*, 2016). Além disso, o embrião produzido *in vitro* representa uma poderosa ferramenta de pesquisa que auxilia no entendimento de questões relativas à biologia do desenvolvimento (Hansen *et al.*, 2014), e no aprofundamento em outras biotécnicas como clonagem, modificação genética (edição genética e transgenia) e estudos com células-tronco (Filho, 2015).

Cabe ressaltar ainda que, a aplicação de métodos avançados de seleção genômica, como a utilização de marcadores moleculares e técnicas de edição genética, tem permitido um maior controle sobre as características genéticas dos embriões produzidos *in vitro* (Mueller; Van Eenennaam, 2022).

No entanto, apesar dos avanços, especialmente na última década (Stroebech *et al.*, 2015), por ser uma técnica amplamente utilizada para a geração de animais geneticamente superiores (Hansen *et al.*, 2014), a PIVE ainda não é capaz de produzir embriões com a mesma qualidade e competência daqueles produzidos *in vivo*. Blastocistos produzidos *in vitro* exibem algumas características associadas à baixa qualidade, como vacúolos nas células trofoblásticas, menos conexões intercelulares, diferenças na expressão gênica, alterações no metabolismo de lipídios (Sudano *et al.*, 2016), nos padrões de expressão gênica (Lonergan *et al.*, 2006) e nos marcadores epigenéticos, que podem continuar após o nascimento (Ramos-Ibeas *et al.*, 2019).

Contudo, a PIVE não consiste em uma biotecnologia isolada mas sim, em uma combinação de técnicas e etapas, como a aspiração folicular guiada por ultrassom (*ovum pick-up*), a sincronização do estro de receptoras, e todos os procedimentos

laboratoriais diretamente envolvidos na produção de embriões que consistem, resumidamente, em três etapas fundamentais: 1) maturação *in vitro* (MIV), 2) fecundação *in vitro* (FIV) de oócitos e 3) cultivo *in vitro* (CIV).

A PIVE é fundamental na reprodução assistida, pois permite aumentar a eficiência reprodutiva, melhorar características genéticas desejáveis, controlar doenças, preservar espécies ameaçadas, aumentar a produtividade de alimentos de origem animal, economizar tempo e recursos, selecionar o sexo dos embriões e melhorar a eficiência alimentar dos animais. Essa biotécnica revolucionou a reprodução assistida ao proporcionar benefícios genéticos, conservação e produção animal mais eficientes e sustentáveis.

1.1.1 Maturação *in vitro* (MIV)

A primeira etapa da PIVE envolve a coleta dos oócitos, seguida da maturação *in vitro*. As técnicas de obtenção oocitária podem ser realizada em doadoras vivas ou em ovários de animais pós- morte (Varago, 2008).

A adequada maturação do oócito é um dos processos determinantes da qualidade subsequente do embrião. Durante essa fase, o gameta feminino passa por processos que são cruciais não apenas para a ativação do genoma embrionário, mas também para o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Gilbert, 2003). Na espécie bovina, a maturação oocitária ocorre de 18 a 24h. Esse processo permite a ocorrência de uma série de eventos nucleares, citoplasmáticos e moleculares, que tornam o gameta feminino apto a ser fecundado (Sanchez *et al.*, 2012).

A maturação nuclear refere-se à progressão da meiose desde a prófase da primeira divisão meiótica até a metáfase da segunda divisão meiótica (MII) no momento da ovulação. Juntamente com a maturação nuclear, ocorrem uma série de mudanças em organelas, proteínas e transcritos no oócito, culminando com a maturação citoplasmática (Hyttel *et al.*, 1997).

Estudos recentes têm mostrado um aumento de lipídios, especialmente, triglicerídeos no oócito, durante a MIV bovina, com ou sem soro fetal bovino (SFB) adicionado ao meio de maturação, embora o SFB tenha um efeito adicional ao processo (Aardema *et al.*, 2011; Del Collado *et al.*, 2015).

Del Collado e colaboradores (2015) constataram acúmulo lipídico nos oócitos após a MIV, o que não foi observado no grupo *in vivo*. Os autores sugerem que, além da suplementação proteica, existem outros fatores no sistema *in vitro* que afetam o metabolismo lipídico. Uma hipótese é que durante a maturação fisiológica, a síntese de lipídios ocorra, concomitantemente, com o seu metabolismo por oxidação, impedindo assim, o excessivo acúmulo lipídico em condições fisiológicas, já que um dos resultados apresentados pelos pesquisadores, foi uma alta correlação entre lipídios e mitocôndrias no grupo *in vivo*.

Na literatura, há um consenso de que um incremento na qualidade oocitária é crucial para o aumento nas taxas de desenvolvimento embrionário, assim como o período pós-fertilização é determinante para a qualidade e competência do blastocisto, incluindo a sobrevivência pós-criopreservação (Lonergan *et al.*, 2003; Hoelker *et al.*, 2014).

1.1.2 Fertilização *in vitro* (FIV)

Após a conclusão da MIV, os oócitos são co-incubados com espermatozoides por 18 a 20 horas durante a FIV. O sêmen bovino passa pelas etapas de descongelamento, seleção e capacitação antes da FIV (Gallego *et al.*, 2022).

Os espermatozoides são selecionados usando técnicas de migração ascendente (swin up) ou gradiente de densidade (Percoll) para remover meios de congelamento, plasma seminal, detritos e espermatozoides mortos (Ferré *et al.*, 2020a). Os espermatozoides também devem ser tratados com fatores de capacitação para adquirir a capacidade de penetrar na zona pelúcida do oócito (Parrish *et al.*, 1986). O número mínimo de espermatozóides necessário por oócito varia entre as raças de touros, embora, geralmente, uma concentração de 1 a 2 milhões de espermatozoides por mL seja comumente usada para FIV (Ward *et al.*, 2002). Nessa etapa ocorre a combinação do material genético dos gametas masculino e feminino e a formação do zigoto (Palma, 2008).

O meio de fecundação, onde os espermatozóides são lavados antes da FIV, devem conter agentes de capacitação, como heparina, penicilamina, hipotaurina e epinefrina, que permitam que o gameta masculino atravesse a zona pelúcida do oócito (Parrish *et al.*, 1986).

In vivo, a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial ocorrem na tuba uterina devido à capacidade desse microambiente de suportar a embriogênese, fornecendo nutrientes, fatores de crescimento, antioxidantes, hormônios sexuais, proteases e outras moléculas reguladoras de gametas e embriões (Marsico *et al.*, 2019). Diferenças entre o processo de fertilização *in vivo* e *in vitro* podem ser observados na figura 1.

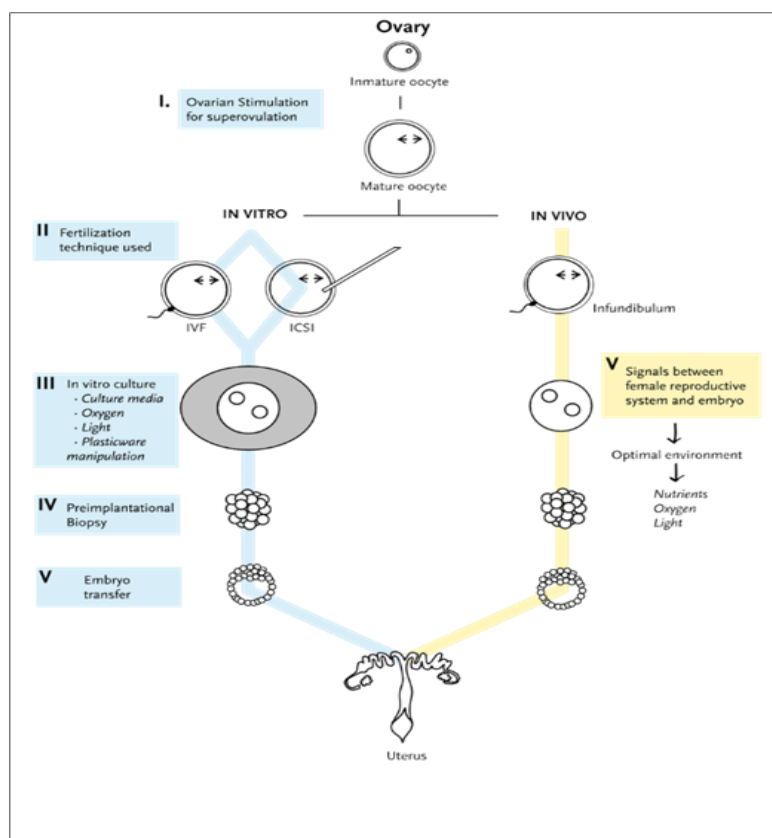


Figura 1: Representação esquemática dos passos da fertilização *in vivo* e *in vitro* em mamíferos. I. A estimulação hormonal ovariana promove a maturação do folículo e, em seguida, a ovulação. II. Na reprodução assistida há diferentes técnicas de fertilização, enquanto *in vivo*, os gametas femininos e masculinos interagem e se fundem no trato feminino (infundíbulo). III. Após a fertilização *in vitro*, o embrião pré-implantação passa um período em condições de cultivo que podem afetar seu desenvolvimento posterior. IV. No final do CIV, podem ser realizadas biópsias do embrião pré-implantação. V. Por fim, o embrião produzido *in vitro* é transferido para uma fêmea receptora e aquele produzido *in vivo* se move em direção ao útero interagindo com o sistema reprodutor feminino em um ambiente ideal. Fonte: Ventura-Juncá, 2015.

1.1.3 Cultivo *in vitro* (CIV)

O cultivo *in vitro* abrange o desenvolvimento do zigoto até o estágio de blastocisto, passando pelas fases de clivagem, ativação do genoma embrionário, compactação e diferenciação dos blastômeros, formação e expansão da blastocele culminando com o rompimento da zona pelúcida (Lonergan *et al.*, 1999).

Ao avaliar a qualidade dos embriões cultivados *in vitro*, com base em características morfológicas, é importante considerar variáveis como o tamanho, forma e compactação dos blastômeros, presença de células extrusadas ou fragmentadas, cor, e se o estágio de desenvolvimento está compatível com o estágio esperado, considerando o tempo após a fertilização (Merton, 2002).

Em comparação com humanos e camundongos, os ruminantes apresentam um maior acúmulo de gotículas de lipídios, que resulta em um citoplasma mais escuro (Van Soom *et al.*, 2003). Essa coloração citoplasmática mais escura dificulta a visualização e a contagem de pronúcleos no zigoto, de modo que essa característica não é confiável para a seleção embrionária em ruminantes, ao contrário do que ocorre em humanos (Lundqvist *et al.*, 2001).

Cabe destacar que diversos fatores podem afetar a qualidade e o desenvolvimento do embrião *in vitro*, sua habilidade de sobrevivência criogênica, capacidade de estabelecimento de gestação e nascimento de bezerras normais. Esses fatores incluem eventos que ocorrem na foliculogênese, mas que também estão associados ao ambiente de produção *in vitro* (meios e suplementos, temperatura, umidade, %CO₂, pH) e à manipulação laboratorial (Marsico *et al.*, 2019).

1.2. METABOLISMO ENERGÉTICO EMBRIONÁRIO

O metabolismo energético embrionário refere-se aos processos metabólicos que ocorrem dentro do embrião durante seu desenvolvimento inicial. Durante essa fase, o embrião depende da produção de energia para sustentar suas atividades e crescimento.

No início do desenvolvimento, quando o embrião é composto por poucas células, o consumo de energia é relativamente baixo. A principal fonte de energia nesse estágio é o piruvato, convertido em adenosina trifosfato (ATP) por meio da fosforilação oxidativa, processo metabólico que ocorre nas mitocôndrias e é responsável por fornecer a energia necessária para as atividades celulares (Thompson *et al.*, 2007; Nelson; Cox, 2011). Até o estágio de 16 células, o consumo de glicose e piruvato permanece baixo, mas no início das fases de compactação e formação da blastocela, a demanda energética aumenta juntamente com o consumo desses substratos e de oxigênio (De Souza *et al.*, 2015; Hu; Yu, 2017).

Nestes estágios ocorre aumento no metabolismo e maior utilização da glicólise. Essas mudanças acontecem simultaneamente com um aumento na síntese de proteínas e na atividade do sistema de transporte de íons, especialmente pelas bombas de Na⁺/K⁺. Todos esses processos estão envolvidos na formação da blastocela (Lima; Souza, 2009). Após a formação do blastocisto, outras fontes de energia são necessárias em maior proporção, incluindo: glicose, aminoácidos e lipídios (Hu; Yu, 2017; D' Souza *et al.*, 2018).

A glicólise ocorre no citoplasma, onde a glicose é quebrada em duas moléculas de piruvato, gerando quantidades menores de ATP. Em seguida, o piruvato entra nas mitocôndrias, onde passa pelo ciclo de Krebs e pela fosforilação oxidativa, resultando em uma produção mais significativa de energia (Nelson; Cox, 2011).

Através do processo de beta oxidação, os lipídios são metabolizados em ácidos graxos e convertidos em acetil-coenzima A (acetil-CoA) por meio do ciclo de Krebs (Talley; Mohiuddin, 2020). Da mesma forma, o metabolismo de alguns aminoácidos pode gerar intermediários metabólicos, como o piruvato ou o acetil-CoA, intermediários nas vias metabólicas para a produção de ATP (Leese *et al.*, 2021).

Assim, a formação de ATP no embrião, bem como em todas as células eucarióticas, ocorre através da glicólise e da fosforilação oxidativa. A glicólise não requer oxigênio (O₂) para as reações metabólicas enzimáticas e gera como produtos, o lactato e quatro moléculas de ATP. A fosforilação oxidativa utiliza substratos como a glicose, o piruvato, aminoácidos e ácidos graxos livres para a formação da acetil coenzima A (Harvey *et al.*, 2002).

Acredita-se que a mudança na via metabólica durante o estágio inicial do desenvolvimento embrionário seja importante para preparar o embrião para a implantação e está diretamente relacionada à ativação do genoma embrionário (Tsuji

et al., 2001; Kikuchi *et al.*, 2002), um evento crucial no desenvolvimento embrionário. A ativação do genoma embrionário leva à produção de enzimas e fatores de transcrição que controlam a expressão gênica e influenciam o metabolismo celular posterior (Harvey, 2019). As diferentes vias metabólicas envolvidas nessa etapa inicial de desenvolvimento estão ilustradas na figura 2 (Dunning *et al.*, 2014).

É importante destacar que o metabolismo da glicose em embriões *in vivo* é considerado normal (Gardner *et al.*, 2000). No entanto, em embriões submetidos à cultura *in vitro*, ele aumenta na presença de altos níveis de oxigênio, processo conhecido como glicólise aeróbica (Khurana; Nieman, 2000). Tal fato pode ser explicado porque *in vitro*, ocorre a falta de um regulador natural da glicólise, que, normalmente, está presente em embriões produzidos *in vivo*. Por isso dizemos que, em ambiente não fisiológico (*in vitro*), embriões que metabolizam grandes quantidades de glicose, comprometem sua capacidade de desenvolvimento (Beitz, 1996; Nelson;Cox, 2011).

Nos embriões PIV, quando a glicólise é excessivamente estimulada, ocorre um aumento na produção de precursores para a síntese de proteínas e lipídios que contribui para o aumento da formação de lipídios citoplasmáticos, ao mesmo tempo, que ocorre um desequilíbrio no estado redox desses embriões. Essas alterações resultam em distúrbios na função mitocondrial e no acúmulo de lipídico embrionário (Barcelo; Seidel, 2007).

Assim, é desejável uma taxa metabólica mais baixa em embriões produzidos *in vitro*, semelhante ao observado em embriões *in vivo*, que são naturalmente mais “silenciosos”. Deve ser alcançado um equilíbrio entre a produção de energia necessária para o desenvolvimento embrionário e a velocidade com que essa energia será usada (Leese, 2012).

A possibilidade de se obter uma melhora na regulação da beta oxidação do complexo cumulus oócito *in vitro* tem sido usada para demonstrar a importância desse mecanismo metabólico para a competência do desenvolvimento, sendo a carnitina, um co-fator essencial para a entrada dos ácidos graxos de cadeia longa no interior das mitocôndrias (Dunning *et al.*, 2014; Paczkowski *et al.*, 2013).

Segundo Dunning *et al.* (2014), a beta-oxidação ocorre em menor escala em oócitos maturados *in vitro* quando comparados àqueles maturados *in vivo*, demonstrando a relação entre essa via de obtenção de energia com processos envolvidos no momento após a ovulação.

Por todo o exposto, é importante ressaltar o papel e a interferência do metabolismo energético no desenvolvimento embrionário, assim como inferir que as taxas metabólicas estão diretamente relacionadas à viabilidade embrionária *in vitro* (Guerif *et al.*, 2013). Além disso, é consenso que muitas alterações metabólicas dos embriões PIV são atribuídas à diferentes condições de cultivo *in vitro*.

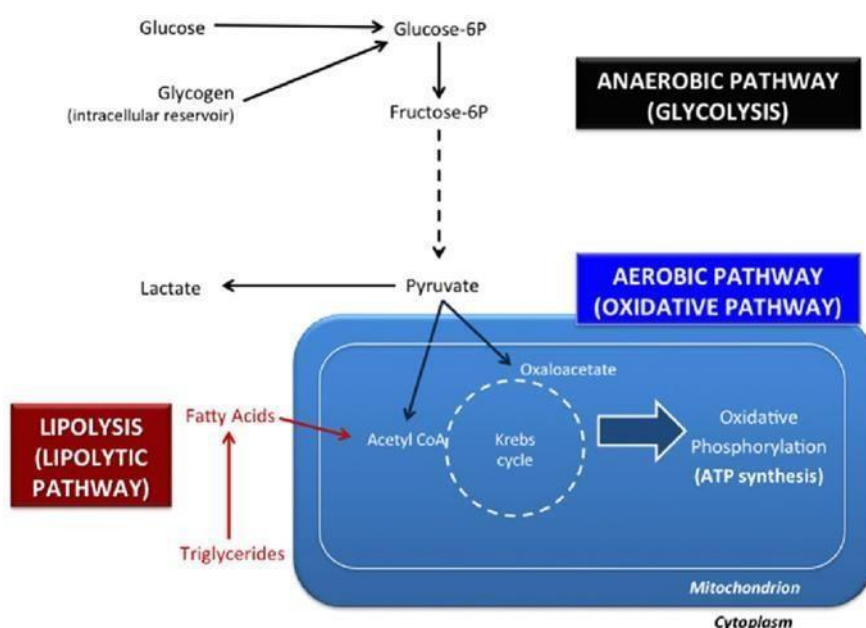


Figura 2. Vias metabólicas essenciais para o desenvolvimento embrionário bovino. A via anaeróbica (glicólise ou via glicolítica) não utiliza oxigênio e gera lactato. A glicose, um dos substratos metabólicos mais importantes para a glicólise, é obtida a partir do meio extracelular ou de reservatórios de glicogênio. Na via aeróbica (ou oxidativa), o piruvato é convertido em oxaloacetato ou acetil-CoA e os ácidos graxos são convertidos em acetil-CoA. A síntese de ATP depende do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa (reações enzimáticas catalisadas por proteínas da membrana mitocondrial interna). A via lipolítica (ou lipólise) permite a oxidação de ácidos graxos, obtidos de reservatórios lipídicos (triglicerídeos) ou do meio extracelular. Fonte: Souza *et al.*, 2015.

1.3 ÁCIDOS GRAXOS NA PIVE

Os lipídios são moléculas hidrofóbicas ou anfipáticas, dinâmicas, envolvidas em funções biológicas vitais como armazenamento de energia, construção de membranas celulares e sinalização intra e intercelular (Benedusi; 2018; O'Donnell *et*

al., 2020). São definidos, de forma ampla, como qualquer composto orgânico insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos (Smith, 2000).

O termo 'lipídios' engloba um amplo conjunto de pequenas moléculas química e estruturalmente diversas que diferem em características como o comprimento da cadeia hidrocarbonada, ramificações, graus de insaturação e grupos funcionais. Essas diferenças podem ser atribuídas às várias transformações bioquímicas que ocorrem durante sua biossíntese (Fahy *et al.*, 2011), sendo a diversidade entre essas moléculas muito maiores do que aquela encontrada nos campos da genômica e proteômica, com um número estimado de variações estruturais que ultrapassa 10⁵ (Züllig; Köfeler, 2021).

Em 2005, o Comitê Internacional de Classificação e Nomenclatura de Lipídios, com o apoio do consórcio Lipid Metabolites and Pathways Strategy (LIPID MAPS), estabeleceu o "Sistema de Classificação para Lipídios". Esse sistema categoriza todos os lipídios em oito grupos: ácidos graxos, glicerolipídios, glicerofosfolipídios, esfingolipídios, esterol lipídios, prenol lipídios, sacarolipídios e policetídeos. Em 13 de janeiro de 2023, o Banco de Dados do LIPID MAPS (LMSD), a maior base de dados online de lipídios, continha 47.800 estruturas únicas de lipídios (Géhin *et al.*, 2023).

O termo 'lipidoma' é utilizado para descrever o perfil completo de lipídios presentes em uma célula, tecido ou organismo, e faz parte do "metaboloma", que engloba as outras três principais classes de moléculas biológicas: aminoácidos, açúcares e ácidos nucleicos. A lipidômica pode ser entendida como uma análise abrangente dos lipídios individuais em um sistema biológico (Baek *et al.*, 2022) e constitui uma área de pesquisa relativamente recente, impulsionada pelos rápidos avanços nas tecnologias analíticas, especialmente a espectrometria de massas, e nos métodos computacionais. Esse avanço ocorreu em paralelo com a descoberta do papel dos lipídios em muitas doenças metabólicas, como obesidade, aterosclerose, derrame, hipertensão e diabetes. Importante destacar que a diversidade observada nas funções dos lipídios está diretamente relacionada à variação nas estruturas de suas moléculas (Fahy *et al.*, 2011). Essas variações estruturais são resultados de fatores como comprimentos variados de cadeias, transformações bioquímicas (oxidação, redução, substituição e formação de anéis), além de modificações com resíduos de açúcar e diferentes grupos funcionais. Não existem estimativas precisas

do número de diferentes estruturas lipídicas na natureza, mas há estimativas da existência de, aproximadamente, 200.000 estruturas diferentes (Yetukuri *et al.*, 2008).

Os lipídios podem se originar inteiramente ou em parte por condensações baseadas em carbanions de cetoacil tioésteres e/ou por condensações baseadas em carbocátions de unidades de isopreno (figura 3). Segundo Christie (1987), os lipídios também podem ser divididos em simples e complexos. Lipídios simples são moléculas geralmente compostas por uma única estrutura lipídica. Essas moléculas consistem principalmente em ácidos graxos, triglicerídeos, esteróis (como o colesterol) e outros lipídios que não apresentam grupos funcionais adicionais. Eles são importantes como fontes de energia e como componentes estruturais das membranas celulares. Os lipídios complexos são compostos por uma combinação de diferentes grupos funcionais e cadeias de ácidos graxos. Esses lipídios incluem fosfolipídios, glicolipídios, esfingolipídios e outros compostos com grupos fosfato, carboidratos ou grupos nitrogenados em sua estrutura e desempenham papéis cruciais na sinalização celular, transporte de substâncias e estruturação das membranas celulares.

A importância biológica dessas moléculas torna essencial a existência de bancos de dados de lipídios, que sejam organizados e catalogados. Essa organização facilita a busca de informações e promove o compartilhamento de conhecimento entre a comunidade científica. Além disso, contribui para o avanço da ciência e das aplicações biomédicas, permitindo uma melhor compreensão da complexidade e importância dos lipídios em diferentes sistemas biológicos. Esses bancos de dados são considerados ferramentas valiosas para a pesquisa, fornecendo um recurso valioso para a comunidade científica, em geral (Fahy *et al.*, 2011).

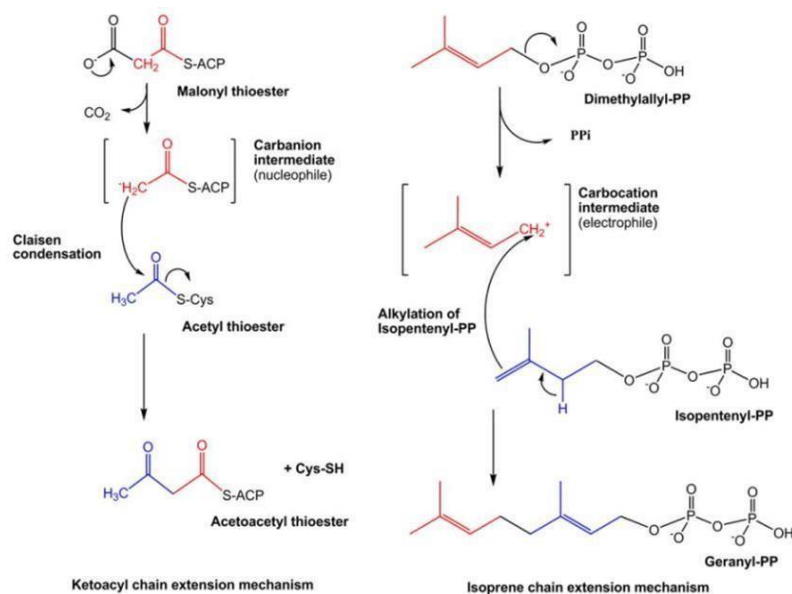


Figura 3: Mecanismos da biossíntese de lipídios. A biossíntese de lipídios contendo cetoacil e isopreno ocorre por extensão de cadeia mediada por carbanions e carbocátions, respectivamente. Fonte: Fahy *et al.*, 2011.

1.3.1 Definição e importância fisiológica dos ácidos graxos

Os ácidos graxos (AGs), são moléculas precursoras de lipídios, compostas por um grupo carboxila terminal e uma cadeia hidrocarbonada, que diferem entre si pelo número de carbonos e níveis de saturação (Chen; Huang, 2019).

Em relação ao número de carbonos, os AGs podem ser definidos de cadeia curta, média ou longa. Os AGs de cadeia curta possuem uma cadeia alifática com até 6 carbonos, não constituem uma importante fonte de energia, mas tem um papel relevante nos processos metabólicos (Layden *et al.*, 2013). Alguns, como o butirato, são reconhecidos por induzirem a apoptose em circunstâncias específicas, exercendo assim um controle sobre a proliferação celular (Hague *et al.*, 1995) e, juntamente, com AGs de cadeia média (apresentam de 6 a 12 átomos de carbono) desempenham várias funções de regulação e sinalização celular (Hara *et al.*, 2013; Nakamura *et al.*, 2014).

Os AGs de cadeia longa são fontes importantes de energia e estão presentes na composição dos lipídios das membranas celulares. Eles podem ser obtidos a partir da alimentação ou sintetizados a partir do acetil-CoA através de um conjunto complexo de reações, incluindo a glicólise e o ciclo do ácido cítrico. (Wakil, 1989).

Em relação ao grau de insaturação, os AGs podem ser saturados, ou seja, não possuem duplas ligações entre os átomos de carbono em sua cadeia carbônica ou insaturados, com uma (monoinsaturados) ou mais duplas ligações entre os átomos de carbono (poliinsaturados) (Martin *et al.*, 2006).

Além de serem componentes essenciais de fosfolipídios e glicolipídios, os AGs também podem atuar como hormônios e mensageiros intracelulares (Garrett *et al.*, 2012).

Em situações de demanda energética, ácidos graxos, que podem ser produzidos a partir da ação de lipases sobre as gotas lipídicas, ou através da biossíntese celular (Downs *et al.*, 2009, Dunning *et al.*, 2014) são metabolizados na mitocôndria, através da beta oxidação, gerando uma grande quantidade de ATP (Nagy; Tiuca, 2017).

Para que as células permaneçam viáveis, é essencial que elas mantenham uma proporção apropriada de ácidos graxos saturados e insaturados em suas membranas biológicas (Ackerman; Simon, 2014). A fluidez da membrana plasmática

está relacionada à proporção entre ácidos graxos saturados e insaturados em sua composição. Uma maior concentração de ácidos graxos insaturados está relacionada a uma maior fluidez a membrana plasmática (figura 4) (Nagy; Tiuca, 2017) e esse é um dos fatores que correlaciona o conteúdo lipídico à viabilidade do embrião após a criopreservação, pois as técnicas de congelamento alteram a integridade da membrana (Dunning *et al.*, 2014), de modo que o perfil lipídico da membrana celular do embrião pode influenciar as taxas de criosobrevivência.

Estudos mostraram que o acúmulo excessivo de ácidos graxos saturados nas membranas pode levar à disfunção mitocondrial, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e estresse no retículo endoplasmático (Ariyama *et al.* 2010; Ackerman; Simon, 2014).

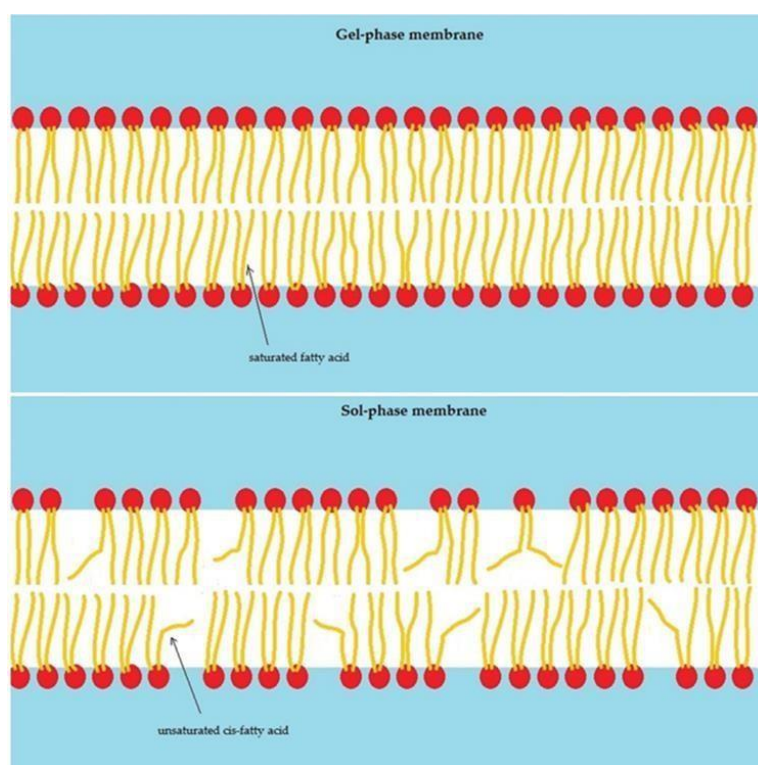


Figura 4. Membrana plasmática com diferentes níveis de fluidez devido à composição de ácidos graxos. Na figura de cima: ácidos graxos saturados formando uma membrana mais viscosa. Na figura de baixo: ácidos graxos insaturados formando uma membrana mais fluida. Fonte: Nagy; Tiuca, 2017.

O Banco de Dados de Estruturas Lipídicas (Lipid Maps Structure Database) (Sud *et al.*, 2006), contém atualmente mais de 7200 moléculas de ácidos graxos demonstrando sua ampla variedade e importância biológica.

1.3.2 Biossíntese e armazenamento de ácidos graxos

A biossíntese de ácidos graxos ocorre mediante um processo chamado lipogênese, que ocorre principalmente no citoplasma das células. A primeira etapa desse processo envolve a formação do ácido graxo mais simples, pela enzima ácido graxo sintase e requer Acetil-CoA, Malonil-CoA e fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) (Nelson; Cox, 2011).

O Acetil-CoA é o intermediário-chave no metabolismo de carboidratos, aminoácidos e lipídios (Wakil; Abu-Elheiga, 2009). O malonil-CoA é produzido a partir da condensação do acetil-CoA e do bicarbonato em uma reação catalisada pela enzima acetil-CoA carboxilase. O Malonil-CoA é o doador de 2 átomos de carbono na síntese de novo de ácidos graxos e desempenha um papel importante como inibidor do sistema de transporte de carnitina/palmitoil para a oxidação de ácidos graxos (McGarry *et al.*, 1977). O malonil-CoA é então utilizado como substrato na reação seguinte, onde se liga a uma enzima chamada ácido graxo sintase, responsável pela síntese dos ácidos graxos.

O processo de síntese de ácidos graxos ocorre de forma repetitiva, adicionando unidades de dois carbonos (acetil-CoA) ao longo da cadeia do ácido graxo em crescimento. Cada adição de dois carbonos envolve a redução sucessiva das unidades de acetil-CoA, utilizando NADPH como doador de elétrons e energia (Nelson; Cox, 2011).

Na presença de NADPH e ácido graxo sintase, a cadeia de carbono é alongada até 16 carbonos (ácido palmítico) após sete ciclos de condensação, redução, desidratação e redução. O ácido palmítico é processado e alongado no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias das células hepáticas para produzir ácidos graxos com cadeias de carbono mais longas (> 16). Esse processo continua até que a cadeia do ácido graxo atinja o tamanho desejado (Kawano; Cohen, 2013).

Essas reações de alongação e dessaturação são catalisadas por enzimas específicas, para produzir ácidos graxos insaturados e com cadeias mais longas (Zeng *et al.*, 2023). Assim, pode-se dizer que a biossíntese de ácidos graxos ocorre através da lipogênese, onde unidades de dois carbonos são adicionadas

repetidamente para formar uma cadeia de ácido graxo, que é posteriormente esterificada a glicerol para formar triglicerídeos (Nelson;Cox, 2011).

Glicogênio e triglicerídeos constituem reservas de energia para o embrião bovino (De Souza *et al.* 2015), no entanto, enquanto a importância do glicogênio é pouco descrita na literatura (Thompson *et al.*, 1995), sabe-se que os triglicerídeos representam o principal reservatório intracelular de energia durante a maturação oocitária (Ferguson; Leese, 2006; Sturmey *et al.*, 2009) e que sua composição varia entre as diferentes espécies (Dunning *et al.*, 2014).

Os triglicerídeos são formados por 1 molécula de glicerol e três moléculas de ácidos graxos que podem diferir no comprimento da cadeia e no grau de saturação (figura 5).

A enzima ácido graxo sintetase é mais abundante nas células cúmulus do que nos oócitos, e está presente nos oócitos antes e após a maturação, suportando a idéia de que a lipogênese é um processo contínuo (Auclair *et al.*, 2013). Essa enzima é responsável pela conversão de acetil-CoA em manoil-CoA que, por sua vez, é convertido em ácido graxo (Downs *et al.*, 2009).

Para a síntese do ácido graxo duas outras enzimas são necessárias: a carboxilase de Acetil-CoA 1 (ACC1) e a carboxilase de Acetil-CoA 2 (ACC2) (Wakil; Abu-Elheiga, 2009). No controle da oxidação de ácidos graxos, a proteína Perilipina 2 (PLIN2), associada a gotículas lipídicas, desempenha um papel importante na regulação do acesso e atividade das enzimas lipolíticas em células do cumulus e oócitos bovinos, garantindo o adequado armazenamento e utilização de lipídios durante o processo de maturação e desenvolvimento dos oócitos (Yang *et al.*, 2010; Aardema *et al.* 2011)

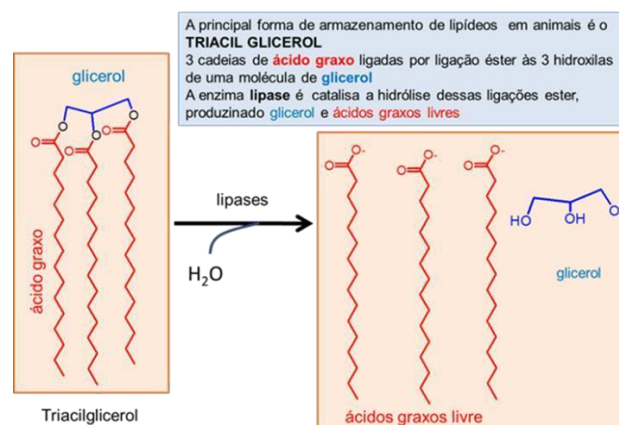


Figura 5. Hidrólise de triglicerídeos

Fonte:<http://bioquimicaufal.blogspot.com/2012/11/aula-07.htm>)

1.3.3 Metabolismo lipídico durante a maturação oocitária

A quantidade e composição de lipídios presentes no fluido folicular têm impacto na proporção e conteúdo de gotículas lipídicas nos oócitos e células do cúmulus, o que está intimamente relacionado com a expressão dos genes envolvidos na síntese, oxidação e transporte de ácidos graxos nas células da parede folicular e nos COCs (Warzych *et al.*, 2017).

Sabe-se que essa captação de ácidos graxos do meio externo para oócitos e células do cúmulus, ocorre de forma diferente, dependendo do contexto hormonal e nutricional e que o catabolismo desses ácidos graxos em ATP ocorre na matriz mitocondrial, através do processo de beta oxidação (Dunning *et al.*, 2010). Como o embrião, em seus estágios iniciais, apresenta uma baixa atividade glicolítica (Dumollard *et al.*, 2009), o metabolismo lipídico através da β -oxidação de ácidos graxos representa a principal fonte de energia durante a fase inicial do desenvolvimento. Alguns estudos *in vitro* têm demonstrado um aumento dos níveis de lipídios no oócito bovino durante a MIV, independentemente, da presença ou ausência de SFB no meio de maturação (Aardema *et al.*, 2011; González *et al.*, 2013).

Quando os oócitos atingem o estágio inicial de folículo terciário, com cerca de 1 mm de tamanho, começam a surgir as primeiras gotículas lipídicas que aumentam, gradualmente, segundo o desenvolvimento do gameta feminino. Aproximadamente 15 horas após o pico do hormônio luteinizante (LH), as mitocôndrias começam a se concentrar ao redor das gotículas nos oócitos em metáfase I (MI) e, aproximadamente 24 horas após o pico de LH, quando o oócito atinge o estágio de metáfase II (MII), as gotas lipídicas e as mitocôndrias estão mais centralizadas (Hyttel *et al.*, 1997).

Essa proximidade espacial entre o retículo endoplasmático as mitocôndrias e as gotas lipídicas sugere uma relação funcional entre essas estruturas nos oócitos bovinos (Brusentsev *et al.*, 2019). O pico de LH induz a β -oxidação em COCs, e a inibição farmacológica desse processo prejudica a maturação do oócito e o desenvolvimento embrionário (Liu *et al.* 2022). Cardoso (2020), observou que o conteúdo lipídico dos oócitos de *Bos taurus* aumentou nas primeiras 4 horas de maturação *in vitro* e permaneceu constante até as 24 horas (Cardoso, 2020).

O metabolismo lipídico, através da β -oxidação, no COCs influencia o potencial de desenvolvimento subsequente do oócito (Mckeegan; Sturmey, 2011; Dunning *et*

al., 2014), não apenas a ativação do genoma embrionário, como o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Gilbert, 2003).

Estudos *in vitro* e *in vivo*, demonstram que alguns ácidos graxos funcionais, principalmente aqueles ditos essenciais, estão envolvidos no desenvolvimento folicular, maturação oocitária, receptividade endometrial, desenvolvimento placentário, desenvolvimento embrionário e desempenho da lactação (Sturme *et al.*, 2009; Aardema *et al.*, 2013). Dunning *et al.* (2010), demonstrou através do ácido palmítico radiomarcado, que sua metabolização em cerca de 15% dos oócitos, contribuiu para aumentar a taxa de maturação *in vitro* (Dunning *et al.*, 2010).

É notável que os ácidos graxos palmítico, esteárico, oléico e linoléico são os tipos mais prevalentes em oócitos de diferentes espécies, sendo, geralmente, os ácidos graxos saturados mais presentes. Os AG de cadeia longa predominantes em oócitos de mamíferos são ricos em energia e, níveis diferentes de ácidos graxos insaturados, como o ácido oleico, podem influenciar a fluidez da membrana celular (Dunning *et al.*, 2014).

No trabalho de Sanchez- Lazo *et al.* (2014), a partir da análise de microarray, foi observado o aumento significativo dos genes relacionados ao metabolismo lipídico nas células do cúmulus de camundongos e bovinos, de oócitos maturados *in vivo*, quando comparados aos oócitos imaturos (Charlier *et al.*, 2012), demonstrando que ocorre uma diminuição da eficiência desse processo quando os oócitos são maturados *in vitro* (Dunning *et al.*, 2014), ressaltado a importância do ambiente folicular ovariano em regulação apropriada e/ou necessidade do suprimento de fatores metabólicos que suportem essa via metabólica. Outro estudo (Ami *et al.*, 2011), demonstra que oócitos maduros, com competência para o desenvolvimento, possuem um perfil lipídico diferente daqueles com estruturas de cromatina imatura, inaptos para completar a meiose e formar blastocistos.

Além disso, durante o curso da maturação, os estoques de lipídios intracelulares passam por uma série de mudanças. Em suínos, após a maturação *in vitro*, as gotas lipídicas exibem um padrão de distribuição periférica (Sturme *et al.*, 2006), enquanto em bovinos, ocorre um pequeno, porém significativo aumento das gotas lipídicas nos oócitos maturados, quando comparados com aqueles em estágio de vesícula germinativa (Aardema *et al.*, 2013).

O triglicerídeo (TG) é o principal lipídio encontrado em oócitos e embriões (Dunning *et al.*, 2014), representando cerca de 36% (w/w) de ácidos graxos (Mcevoy

et al., 2000). São sintetizados no retículo endoplasmático pela ação da enzima diacilglicerol aciltransferase 2 (DGAT2), responsável por converter diacilglicerol e acil-CoA em TG, durante a última etapa de síntese (Stone *et al.* 2009).

Uma vez sintetizados, os TGs podem ser metabolizados ou acumulados nas gotas lipídicas. As gotas lipídicas, por sua vez, ficam rodeadas por proteínas denominadas “PAT proteins”, como a pirilipina 2 (PLIN2), em oócitos murinos (Yang *et al.*, 2010) e bovinos (Aardema *et al.*, 2011). Ambas as proteínas, DGAT2 e PLIN2, são biomarcadoras para o acúmulo lipídico, pois além de serem responsáveis pela síntese dos TG e gotas lipídicas estão relacionadas com a entrada de TG nas gotas e, em consequência, com o tamanho das mesmas (Kuerschner *et al.*, 2009; Bickel *et al.*, 2009). A pirilipina 3 (PLIN3) é outra proteína relacionada ao metabolismo lipídico, associada a gotas lipídicas recém-formadas quando as células são desafiadas com um ambiente de alto nível de lipídios. A PLIN3, também conhecida como Tail-interacting protein of 47 kDa (TIP47), atua como uma proteína estrutural e está localizada na superfície das gotículas lipídicas, onde interage com outras proteínas, incluindo a PLIN2, para regular o acúmulo e o armazenamento lipídico (Nose *et al.*, 2013).

Apesar da alta demanda energética, principalmente durante as primeiras divisões celulares, o oócito possui um mecanismo para evitar o esgotamento das reservas de lipídios. Esse mecanismo é provavelmente mediado pela proteína PLIN2, cuja expressão é aumentada antes e depois do estágio de maturação em oócitos bovinos (Sastre *et al.*, 2014). Da mesma forma, se o processo de formação e manutenção das gotas lipídicas for prejudicado, a maturação do oócito também será afetada. Por exemplo, a perda das proteínas *fatty acid binding protein 3* (FABP3) e *fatty acid binding protein 7* (FABP7), que estão envolvidas na captação de ácidos graxos, ou a PLIN2, leva a um aumento na relação NADP/NADPH e nos níveis de ERO durante a hipóxia, resultando em morte celular (Welte; Gould; 2017).

Após a hidrólise dos triglicerídeos, os ácidos graxos são transportados para as mitocôndrias onde são metabolizados. Esse transporte é dependente das enzimas carnitina palmitoiltransferases (CPT1 e CPT2) e do co-fator carnitina, elementos críticos para ocorrer o transporte livre de ácidos graxos ativos (acil graxo-CoA) para o interior das mitocôndrias e ocorra a beta-oxidação gerando ATP (Bonfont *et al.* 2004). Enquanto a CPT1 é responsável pelo transporte de ácidos graxos ativos para o interior das mitocôndrias, a CPT2 desfaz a ligação entre a carnitina e o ácido graxo,

promovendo a oxidação no ácido graxo ativado (acil graxo-CoA) no interior das mitocôndrias com a geração de acetil-CoA (o número de moléculas dependerá do comprimento da cadeia do ácido graxo (Dunning; Robker, 2017).

A enzima carnitina palmitoiltransferase I (CPT1B) tem papel fundamental na β -oxidação dos ácidos graxos durante a maturação e o desenvolvimento embrionário (Ye et al., 2010). Observou-se a expressão de *Cpt1b* em COCs de camundongos, e a sua expressão aumentou consideravelmente após a administração de hormônios que estimulam a maturação do oócito e a ovulação (Dunning *et al.*, 2010). Esses achados reforçam o papel central do metabolismo lipídico no processo de maturação do oócito e no desenvolvimento embrionário, fornecendo novas percepções sobre os mecanismos que regulam a qualidade dos oócitos e embriões.

Embora a β -oxidação de ácidos graxos livres (AGL) seja essencial para promover o desenvolvimento adequado do oócito, e os benefícios dos lipídios para a maturação do oócito sejam bem conhecidos, um excesso de gotas lipídicas pode resultar em embriões de baixa qualidade do ponto de vista morfológico e molecular.

Tal fato ressalta a importância do controle do metabolismo lipídico durante a maturação oocitária a fim de assegurar um adequado desenvolvimento embrionário. É fundamental manter a homeostase lipídica para evitar desequilíbrios que possam comprometer a qualidade e o desenvolvimento dos embriões (Dubeibe *et al.*, 2019).

Avanços no entendimento das peculiaridades biológicas do metabolismo lipídico e seus impactos na qualidade de gametas e embriões, são necessários para projetar aporte adequado de suplementação nos meios de cultivo, como uma estratégia para otimizar a produção de embriões *in vitro* e os resultados provenientes tecnologias de reprodução assistida.

1.3.4 Importância dos ácidos graxos durante o desenvolvimento pré-implantacional de embriões bovinos

Desde a década de 1960, a análise de lipídios em sistemas biológicos tem sido uma área de pesquisa intensiva (Montani *et al.*, 2019). No entanto, com o advento da lipidômica, essa pesquisa ganhou ainda mais destaque. A lipidômica visa compreender de maneira abrangente a influência dos lipídios no sistema biológico,

incluindo seus papéis na sinalização celular, na modulação transcricional e traducional, bem como suas respostas às mudanças ambientais. Esse campo de estudo nos permite ter uma visão mais completa e aprofundada do papel dos lipídios nas diversas atividades celulares e em respostas adaptativas do organismo (Khan *et al.*, 2021).

Os lipídios são definidos como pequenas moléculas hidrofóbicas ou anfipáticas com diversas funções biológicas. Atuam como importantes substratos energéticos, mediadores da sinalização celular e constituintes da membrana plasmática. Os lipídios biológicos fazem parte de um grupo de moléculas naturais e são representados, principalmente, por ácidos graxos, eicosanóides, mono, di e triglicerídeos, fosfolipídios, esfingolipídios, esteróis e vitaminas lipossolúveis (Vance; Vance 2008; Fahy *et al.*, 2009).

Os ácidos graxos são precursores da síntese esteroideogênica, de eicosanóides e de prostaglandinas e participam da ancoragem de proteínas nas membranas celulares (Dunning *et al.*, 2014). Atuam como mediadores na sinalização celular (Prates, 2014) e são armazenados, intracelularmente, como triglicerídeos, dentro de gotículas lipídicas que, juntamente, com os ésteres de colesterol (EC), constituem as principais fontes de energia intracelular (Bertevello *et al.*, 2018). De modo geral, os lipídios agem como moléculas sinalizadoras que participam ativamente das vias metabólicas embrionárias (Hu;Yu; 2017) e contribuem para eventos-chave durante o desenvolvimento embrionário, implantação e crescimento pós implantacional (Burnum *et al.*, 2009).

É reconhecido que apesar dos avanços nas técnicas de PIVE, as condições de cultivo *in vitro* impactam os processos metabólicos, transcricionais e epigenéticos dos oócitos e embriões (Kues *et al.*, 2008; Tesfaye *et al.*, 2009; Del Collado *et al.*, 2017), sendo o acúmulo lipídico embrionário, uma das consequências negativas do ambiente *in vitro*, que impactam diretamente os resultados de criopreservação (Sudano *et al.*, 2011).

Apesar de ser amplamente descrita na literatura a relação inversamente proporcional entre conteúdo lipídico e criosobrevivência embrionária (Rizos *et al.*, 2003), é importante destacar que os lipídios são essenciais para todas as células, já que a β -oxidação mitocondrial dos ácidos graxos é uma das principais vias metabólicas para fornecer energia às células (Cummin, 2004).

De acordo com Sudano *et al* (2016), ocorre uma variação dinâmica dos lipídios durante diferentes estágios do desenvolvimento inicial do embrião bovino, sendo, portanto, crucial a realização de mais estudos nesta área a fim de ampliar nossa compreensão sobre os mecanismos envolvidos no metabolismo lipídico durante o desenvolvimento embrionário. Isso nos permitirá otimizar as condições de cultivo, a qualidade e as taxas de criosobrevivência dos embriões produzidos *in vitro*, com impactos diretos nos resultados das tecnologias de reprodução assistida.

1.4 ESTRATÉGIAS PARA REDUÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO EMBRIONÁRIO

Entre os desafios associados aos embriões produzidos *in vitro*, destaca-se a sua sensibilidade à criopreservação, em comparação com as contrapartes derivadas *in vivo* (Riha *et al.*, 2002; Dias, *et al.*, 2020; Ferré, *et al.*, 2020b). Essa maior suscetibilidade à criopreservação está relacionada às condições de cultura subótimas (Lonergan *et al.*, 2003) que podem levar à redução da qualidade e acúmulo lipídico.

De acordo com Sudano e colaboradores (2016), ocorre um aumento significativo do conteúdo lipídico embrionário do estágio de 8 -16 células até mórula, seguido de uma diminuição até o estágio de blastocisto.

Ainda que não se tenham esclarecido completamente os mecanismos pelos quais os embriões produzidos *in vitro* acumulam mais lipídios, sabe-se que o acúmulo de triglicerídeos e ácidos graxos livres pode prejudicar as funções mitocondriais e do retículo endoplasmático, interferindo na competência de desenvolvimento embrionário (Wu *et al.*, 2011).

Algumas estratégias utilizadas para reduzir os níveis de lipídios são: delipidação mecânica, suplementação com ácidos graxos e utilização de reguladores metabólicos nos meios de cultivo (Braga *et al.*, 2019).

A delipidação mecânica inclui métodos físicos, como centrifugação e micromanipulação, para remover ou interromper a formação de gotas lipídicas do citoplasma. Nesse método, ocorre polarização das gotas lipídicas citoplasmáticas para que, em seguida, ocorra remoção física do excesso de lipídios (Pereira; Marques, 2008; Gerelchimeg *et al.*, 2009). Um dos primeiros a tentar essa abordagem foi Nagashima *et al.* (1994) como uma alternativa combinada para reduzir as gotículas

lipídicas em oócitos suínos. Seus resultados mostraram melhora na resistência ao congelamento, mas não houve diferenças significativas no desenvolvimento embrionário a partir de oócitos total ou parcialmente delipidados.

Cabe enfatizar que, além da técnica de delipidação ser trabalhosa e demorada, pode alterar o potencial de desenvolvimento dos embriões após a transferência para as receptoras. Dessa forma, apesar de existirem relatos na literatura demonstrando uma relação direta entre remoção das gotas lipídicas por esse método e aumento da sobrevivência embrionária após a criopreservação (Nagashima *et al.*, 1994; Hara *et al.*, 2005; Seidel, 2006), novos estudos têm buscado métodos não invasivos e menos laborosos, de redução do conteúdo de lipídios citoplasmáticos dos embriões bovinos (Marinho, 2010).

Embora a adição de lipídios possa parecer controversa, uma vez que oócitos e embriões já possuem um alto conteúdo lipídico, estudos recentes mostraram que a suplementação com ácidos graxos pode ser benéfica (Aardema, *et al.*, 2011), pois acelera o metabolismo lipídico (revisado por Clarke, 2018). No estudo de Oseikria (2016), uma dose de 1 μ M - de ácido docosahexaenóico (DHA), um ácido graxo essencial ômega-3 durante a MIV, melhorou as taxas de clivagem de embriões bovinos partenogênicos ou fertilizados, embora não fossem encontradas diferenças na expressão de genes relacionados ao metabolismo de ácidos graxos. De forma semelhante, Hoyos-Marulanda, *et al.* (2019), verificaram que a suplementação na MIV com 50 μ M de DHA melhorou as taxas de clivagem e reduziu o conteúdo lipídico dos blastocistos.

Uma alternativa é a utilização de reguladores metabólicos nos meios de maturação e cultivo embrionários (Dias, *et al.*, 2020; Raza *et al.*, 2021; Ghanem *et al.*, 2022).

Os reguladores metabólicos são substâncias capazes de reduzir ou modificar o conteúdo de lipídios intracelular. Essas substâncias tem sido utilizadas com sucesso, na produção de embriões (De la Torre- Sanchez *et al.*, 2006; Prates *et al.*, 2012). Porém, não há um consenso relacionado à melhor estratégia de modulação lipídica, uma vez que já foram testados diversos moduladores, em variadas concentrações e em diferentes etapas da PIVE (Correia, 2019) e os resultados obtidos, até o momento, ainda não são conclusivos.

A suplementação com agentes delipidantes se mostra promissora na melhoria dos resultados de criosobrevivência de embriões bovinos produzidos *in vitro*, mas não

está claro ainda, o momento ideal de introdução dessas substâncias no meio de cultivo, ou seu impacto na qualidade e/ou metabolismo dos embriões produzidos. Apesar de frequentemente resultarem na redução do conteúdo lipídico, nem sempre as estratégias utilizadas tem contribuído para melhores taxas de criosobrevivência (Dias *et al.*, 2020). Essas descobertas indicam que a relação entre o conteúdo de lipídios e a criotolerância em embriões produzidos *in vitro* é complexa e é uma área que ainda deve ser explorada pelos grupos de pesquisa.

Dessa forma, dada a importância das biotécnicas de reprodução assistida, como ferramentas importantes para o melhoramento genético e para o desenvolvimento da agricultura e pecuária no Brasil e no mundo, e por não existir ainda, uma estratégia eficiente de modulação do metabolismo lipídico de embriões PIV, neste trabalho, iremos avaliar os resultados da adição, na MIV, de dois reguladores metabólicos, a L-carnitina e a forskolina, e uma nanopartícula de óxido de zinco, em relação ao desenvolvimento embrionário, acúmulo lipídico, número de células totais, criosobrevivência, viabilidade mitocondrial e produção de radicais livres. Pretendemos contribuir na ampliação do entendimento sobre os mecanismos envolvidos no acúmulo lipídico, assim como propor novas abordagens que aprimorem a qualidade e o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

1.4.1 O uso de reguladores metabólicos no desenvolvimento de embriões bovinos *in vitro*

1.4.1.1 Carnitina

A carnitina é uma amina quaternária de ocorrência natural com o estereoisômero L (3R) -3-hidroxi-4 (trimetilazaniumil) butanoato, com potente bioatividade (Dunning; Robker 2017), sintetizada no fígado a partir da lisina e metionina (Mishra *et al.*, 2016).

Uma de suas funções é atuar como co-fator essencial para beta-oxidação dos ácidos graxos nas mitocôndrias (Knitlova *et al.*, 2017; Dunning; Robker, 2017; Dias *et al.*, 2020), ou seja, a beta-oxidação de ácidos graxos requer a L-carnitina para

transportar os ácidos graxos do citosol para as mitocôndrias (Dunning *et al.*, 2014). Na mitocôndria, a carnitina é liberada dos ácidos graxos e se liga ao acetil-CoA, formando acetil-carnitina que, por sua vez, é transportada para o citoplasma, que volta novamente à forma de L-carnitina (Held- Hoelker *et al.*, 2017).

Estudos utilizando inibidores farmacológicos tem confirmado o papel essencial da beta oxidação tanto na maturação nuclear do oócito como na aquisição da competência ao desenvolvimento, tanto em ratos (Paczkowski *et al.* 2013) como em bovinos e suínos (Dunning *et al.* 2010; Paczkowski *et al.* 2013; Sudano *et al.*, 2016), assim como no aumento do número de células da massa celular interna (Dunning *et al.* 2010). Interessante notar a expressão diferenciada de genes envolvidos na via da beta oxidação em células do cumulus que sofreram maturação *in vitro*, em comparação com aquelas que passaram maturação *in vivo* (Dunning *et al.*, 2014).

A competência de desenvolvimento de oócitos e embriões de mamíferos está intimamente associada à sua atividade metabólica (Thompson *et al.*, 2007). A produção de energia durante a MIV é de particular interesse em espécies com altos níveis de lipídios armazenados, como bovinos, ovinos e suínos (revisado por Dunning *et al.*; 2014), pois a capacidade de um zigoto para concluir com sucesso o desenvolvimento embrionário pré-implantacional, implantar no útero e evoluir para uma prole saudável, depende da qualidade ou competência de desenvolvimento do oócito (Dunning; Robker, 2017).

É provável que a L-carnitina contribua para melhorar a qualidade do gameta feminino tanto por favorecer a beta oxidação e, conseqüentemente, o metabolismo lipídico e suprimento energético ao oócito, como pela redução estresse oxidativo, graças à sua capacidade antioxidante (Ye *et al.*, 2010; Dunning; Robkner, 2017).

A suplementação com L-carnitina está associada à redistribuição de gotículas lipídicas intracelulares em oócitos bovinos (Chankitisakul *et al.*, 2013), redução no conteúdo lipídico intracelular em oócitos suínos (Somfai *et al.*, 2011) e à um aumento significativo da atividade mitocondrial de oócitos de camundongos (Wu *et al.*, 2011), bovinos (Hashimoto, 2009) e suínos (Somfai *et al.*, 2011).

Por outro lado, o excesso de geração de espécies reativas de oxigênio tem um efeito oposto. As ERO podem interferir na função mitocondrial, diminuindo a eficiência da beta- oxidação e, conseqüentemente, contribuindo para o acúmulo lipídico (Van Hoeck *et al.*, 2015).

No trabalho de Somfai *et al.* (2011), oócitos suínos maturados com e sem L-carnitina (92,5 mM), foram fertilizados e cultivados *in vitro* até o estágio de blastocisto.

Em seguida, foram avaliados quanto à maturação nuclear, formação de aglomerados mitocondriais, acúmulo lipídico, fertilização e desenvolvimento embrionário. A proporção de oócitos em metáfase II foi maior, tanto em oócitos mais competentes (do ponto de vista meiótico) como naqueles menos competentes, tratados com L-carnitina, assim como a taxa de blastocistos foi significativamente maior no grupo tratado com o regulador metabólico. Este foi o primeiro estudo demonstrando o efeito da L-carnitina em oócitos suínos com diferentes competências meióticas e de desenvolvimento, coletados de folículos de diferentes tamanhos. Nos oócitos suínos em metáfase II, tratados com L-carnitina, foram encontradas mitocôndrias ativas em altas densidades tanto na área periférica quanto na central, enquanto em oócitos não tratados, as mitocôndrias foram distribuídas principalmente na periferia citoplasmática (Somfai *et al.* 2011).

Em 2017, Knitlova *et al.* também relatou um conteúdo lipídico significativamente menor nos oócitos bovinos, menos competentes do ponto de vista meiótico, após a maturação com L-carnitina. Este estudo mostrou o diferente impacto da suplementação de L-carnitina na maturação de oócitos bovinos, em relação às competências meióticas e desenvolvimento. Enquanto os oócitos menos competentes do ponto de vista meiótico utilizam L-carnitina para promover sua maturação citoplasmática e melhorar o desenvolvimento embrionário, os oócitos mais competentes a utilizam para acelerar a formação e expansão do blastocisto. Uma das descobertas interessantes deste estudo é que, em oócitos e embriões bovinos, o efeito da L-carnitina é específico e depende da competência meiótica e do grau de desenvolvimento do oócito.

Assim, como as células do cúmulus e oócitos não têm a capacidade de biossintetizar a L-carnitina, a partir de aminoácidos precursores (Montjean *et al.*, 2012), o ideal é a realizar a suplementação dos meios de cultivo com esse regulador metabólico, considerado um modulador lipídico benéfico quando adicionado ao meio de cultivo embrionário (Takahashi *et al.*, 2013).

Efeitos positivos da suplementação de L-carnitina foram demonstrados em vários estudos, incluindo melhoria no desenvolvimento embrionário (Sutton *et al.*, 2012; Held-Hoelker *et al.*, 2017), metabolismo lipídico (Dunning *et al.*, 2011) e taxas de sobrevivência após a criopreservação (Takahashi *et al.*, 2013; Chankitisakul, *et al.*, 2013).

No entanto, embora existam muitos estudos sobre os efeitos da L-carnitina no desenvolvimento embrionário bovino e na criosobrevivência, seu impacto na qualidade dos embriões produzidos *in vitro*, muitas vezes, apresenta-se contraditório entre diferentes pesquisadores (Carrillo-González, *et al.*, 2023) e não há um consenso quanto à melhor estratégia de utilização, em relação ao momento de sua adição e concentração durante a PIVE, (Held- Hoelker *et al.*, 2017; Zolini *et al.*, 2019).

1.4.1.2 Forscolina

A forskolina foi o primeiro princípio ativo a ser aprovado na Índia, em 2006. É um alcaloide ativo, derivado das raízes da planta *Coleus forskohlii* (Lamiaceae), descoberto por cientistas em 1974 (Wagh *et al.*, 2012). A forskolina é um diterpeno lipossolúvel que pode penetrar nas membranas celulares (Wagh *et al.*, 2012), ativador de lipases endógenas e da enzima adenilato ciclase, responsável por aumentar os níveis intracelulares de adenosina 3',5' - monofosfato cíclico (AMPc), através da conversão de ATP em AMPc, e, portanto, capaz de induzir lipólise (Seamon; Daly, 1981; Men *et al.*, 2006).

O AMPc é o sistema mais importante na regulação da lipólise (Lafontan; Berlan, 1993). Uma vez formado, estimula a produção da proteína quinase (PK) para catalisar a fosforilação de enzimas-alvo ou fatores de transcrição. No caso dos lipídios, a PK fosforila a lipase triacilglicerol, que causa a lise dos triglicerídeos, liberando ácidos graxos e glicerol (Faherty *et al.*, 2007; Campbell; Farrel, 2008; Nelson; Cox, 2011).

De uma forma geral, agentes lipolíticos agem sobre vários componentes do mecanismo de transdução de sinal lipolítico, estimulando a hidrólise de lipídios intracelulares (Honnor *et al.*, 1985). No caso de embriões produzidos *in vitro*, são particularmente importantes pois, a presença de gotas lipídicas presentes no citoplasma desses embriões, especialmente nos estágios iniciais do desenvolvimento, os tornam mais sensíveis às injúrias do ambiente de cultivo *in vitro* e tem um impacto direto na criosobrevivência (Almiñana; Cuello, 2015).

Men *et al.* (2006) observaram que o tratamento de embriões de suínos com 10 μ M de forskolina reduziu, significativamente, a quantidade de lipídios citoplasmáticos sem efeito deletério no desenvolvimento embrionário. Do mesmo modo, o trabalho

pioneiro de Paschoal *et al.* (2014) utilizando 10 μM forskolina no D6 do desenvolvimento, demonstrou o efeito positivo na criotolerância, sem efeitos deletérios no desenvolvimento embrionário, possivelmente, devido à redução parcial do conteúdo lipídico através do estímulo à lipólise intracelular.

No trabalho de Sanches *et al.* (2013), foi adicionado 10 μM de forskolina no meio de cultivo no D5 e, em seguida, os embriões foram cultivados por 48h. No D7, os blastocistos dos dois grupos (forskolina e controle) foram vitrificados. Nesse primeiro experimento, não houve diferença entre o grupo tratado com o modulador lipídico e o grupo controle, em relação às taxas de re-expansão e eclosão, pós a vitrificação. No entanto, em um segundo experimento com o mesmo protocolo, objetivou-se avaliar a taxa de prenhez. Nesse caso, embriões tratados com a forskolina demonstraram significativo aumento na taxa prenhez, quando comparados ao grupo controle, o que parece ser um trabalho pioneiro, no que se refere ao relato de taxas de prenhez de embriões vitrificados de *Bos indicus* tratados com a forskolina.

Paschoal e colaboradores (2017) avaliaram diferentes concentrações de forskolina (2.5 μM , 5 μM , e 10 μM) durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos e, apesar de não observarem diferenças nas taxas de desenvolvimento, constataram uma redução no acúmulo lipídico nos grupos tratados com 2.5 μM e 5 μM de forskolina no meio de cultivo.

Meneguel *et al.* (2017) não encontraram diferenças na taxa de desenvolvimento embrionário nos grupos de embriões tratados com forskolina. No entanto, os autores observaram uma redução no conteúdo lipídico e um aumento na criosobrevivência em embriões tratados com 5 μM de forskolina durante 24 horas antes da vitrificação.

Em outro estudo (Costa *et al.*, 2019), o objetivo foi avaliar os efeitos da suplementação com forskolina sobre o desenvolvimento embrionário, conteúdo lipídico e níveis de transcritos (foram avaliados 47 genes) de embriões produzidos *in vitro*. A forskolina foi adicionada no D5, na concentração de 10 μM . A avaliação dos embriões foi feita no D7 e eclosão no D10. Como resultados, não foram observadas diferenças na taxa de desenvolvimento embrionário e no acúmulo lipídico entre o grupo tratado com forskolina e o grupo controle, porém foram encontradas diferenças na expressão de transcritos, entre eles, genes relacionados ao metabolismo lipídico e um número maior de embriões eclodidos no D10, no grupo tratado com forskolina, o

que pode estar relacionado à melhor competência de desenvolvimento dos embriões tratados com o regulador metabólico.

Paschoal *et al.* (2015) encontraram atividade lipolítica eficaz no tratamento de embriões bovinos com baixas doses de forskolina (2,5µM de forskolina), porém os autores não avaliaram o impacto da redução do conteúdo lipídico na criotolerância. Como pode-se observar nos estudos acima, ainda não foi estabelecido o melhor protocolo de adição de forskolina, como concentração, etapa da PIVE e o tempo de exposição mais eficazes. Sabe-se que os efeitos do aumento dos níveis de AMPc são inespecíficos sobre o metabolismo (Seamon *et al.*, 1981), de modo que a forskolina pode exercer efeitos ainda não conhecidos sobre as células embrionárias (Sanchez *et al.*, 2013). Dessa forma, são necessários mais estudos com esse regulador metabólico a fim de avaliar para avaliar outros possíveis efeitos que possam impactar no desenvolvimento embrionário, como produção de radicais livres e atividade mitocondrial.

1.5 CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS

A criopreservação de embriões é uma técnica utilizada em reprodução assistida para preservar a viabilidade embrionária em temperaturas extremamente baixas (-196°C), durante longos períodos (Bhat; Sofi, 2021). Os embriões permanecem em um estado de letargia, reversível após a descongelação. É uma estratégia que permite a formação de bancos de embriões visando à preservação de material genético e transporte longo, como nos casos da comercialização de embriões entre países (Sudano *et al.*, 2013), além da conservação de embriões excedentes de um programa de PIVE, para programação logística de uso posterior. O uso de receptoras, cujo custo possui alta representatividade em programas de PIVE/TE, também é otimizado com embriões criopreservados através da possibilidade de redução da utilização de hormônios para a sincronização do ciclo estral (Oliveira, *et al.*, 2020).

Em bovinos a técnica ainda apresenta desafios, como sobrevida embrionária e fetal subótimas. Segundo dados da International Embryo Technology Society (IETS), no período entre 1997 a 2017, cerca de 80% do total de embriões PIV produzidos, foram transferidos a fresco, o que reflete o fato que os embriões produzidos *in vitro*

têm menor criotolerância do que seus equivalentes *in vivo* (Abe *et al.*, 2002, Rizos *et al.* 2003, Pereira *et al.* 2008, Sudano *et al.*, 2013; Ferré *et al.* ,2020b). Vários autores concordam (Abe *et al.*, 2002; Rizos *et al.*, 2003; Barcelo-Fimbres; Seidel, 2007) que essas diferenças podem ser, em parte, atribuídas às condições inerentes do cultivo *in vitro*

A sobrevivência dos embriões após a criopreservação é um processo complexo, afetado por diversos fatores, incluindo o teor e composição lipídica, o metabolismo embrionário, a taxa de apoptose e a expressão geral de genes (Polge, 1977). De acordo com Amstislavsky *et al.* (2019), a abundância de lipídios é um dos fatores mais críticos na criopreservação de oócitos e embriões em estágio pré-implantacional. Esses aspectos acrescidos à crescente demanda pela produção de embriões bovinos *in vitro*, tem direcionado muitos estudos para a investigação de estratégias que possam contribuir para tornar a criopreservação um processo mais eficiente (Sanches *et al.*, 2017).

1.5.1 Crioprotetores

O princípio da criopreservação é remover a maior quantidade possível de água do interior das células antes do congelamento, para evitar a formação de grandes cristais de gelo que podem comprometer seu metabolismo e sua viabilidade após o descongelamento. Por esse motivo, as estratégias de criopreservação são baseadas em dois fatores principais: tempo de resfriamento e de aquecimento e escolha de crioprotetores adequados (Vajta; Kuwayama, 2006).

Várias combinações de crioprotetores, concentrações e períodos de exposição, já foram propostas (Marsico *et al.*, 2019) como estratégias de associações entre crioprotetores com diferentes características de permeabilidade, como o etilenoglicol usado em associação com dimetilsulfóxido (DMSO) ou propilenoglicol, que apresenta melhores taxas de eclosão embrionária pós reaquecimento (Manjunatha *et al.*, 2009).

Cada crioprotetor tem uma permeabilidade diferente, sendo necessário portanto, determinar um equilíbrio entre a concentração, o tempo e a temperatura de exposição trabalho, a fim de se conseguir bons resultados com a técnica. Também

são necessários ajustes nos protocolos, dependendo da espécie ou do estágio de desenvolvimento embrionário.

Durante as últimas décadas, uma ampla faixa de crioprotetores tem sido usada nos protocolos de criopreservação de embriões, os quais podem ser divididos em três grupos: 1) Crioprotetores permeáveis de baixo peso molecular, como glicerol, DMSO propilenoglicol, etilenoglicol e outros álcoois; 2) Não permeáveis, de baixo peso molecular: sacarose, tetralose e outros açúcares, 3) Não permeáveis de alto peso molecular, como: PVA e outros polímeros (Palasz; Mapletoft, 1996).

O DMSO foi um dos primeiros crioprotetores utilizados (Zeilmaker *et al.*, 1984), mas essa abordagem foi rapidamente substituída (Lassalle *et al.*, 1985). A substância mais comum e aceita para vitrificação é o etilenoglicol, que possui baixa toxicidade e alta permeabilidade (Emiliani *et al.*, 2000). Enquanto DMSO, etilenoglicol e sacarose são os crioprotetores de escolha para embriões suínos e bovinos, o glicerol e o etilenoglicol são os mais utilizados para embriões eqüinos (Kingma *et al.*, 2011).

1.5.2 Métodos de criopreservação

As técnicas de criopreservação utilizadas em laboratórios de reprodução assistida são o congelamento lento e a vitrificação (Estudillo *et al.*, 2021). O termo congelamento é adotado para as técnicas onde ocorre a cristalização (formação de cristais de gelo) parcial ou total dos meios de criopreservação. Por outro lado, o termo vitrificação é empregado para as técnicas em que os meios de criopreservação sofrem passagem direta do estado líquido para um estado vitrificado e amorfo, sem que ocorra o fenômeno da cristalização.

Os primeiros resultados foram obtidos com a técnica de congelamento lento (Estudillo *et al.*, 2021). Em 1776, Lazaro Spallanzani realizou a primeira criopreservação de gametas, especificamente espermatozoides humanos (Friberg; Gemzell, 1973; Barkay, 1974). No entanto, a primeira criopreservação bem-sucedida de espermatozoides humanos que resultou em gestações e nascimentos vivos, foi relatada por Sherman e Bunge em 1953 (Sherman, 1973).

A criopreservação de embriões precede a criopreservação de oócitos. Em 1971, Whittingham relatou a primeira criopreservação de embriões de camundongo (Whittingham, 1971) e, posteriormente, embriões de outras espécies foram criopreservados (Ali, *et al.*, 2017), incluindo bovinos (Wilmot; Rowson, 1973) Em 1985, Rall relatou a vitrificação de embriões de camundongo (Rall; Fahy, 1985) e, dez anos depois, embriões humanos no D2 foram vitrificados (Ali, 1995).

Em 1992, Arav desenvolveu a técnica de "tamanho mínimo de gota" e obteve um aumento na taxa de resfriamento, evitando a formação de cristais de gelo, com uma concentração reduzida de volume e crioprotetores (Cobo *et al.*, 2008).

Desde a primeira gestação e nascimento humano a partir de embriões criopreservados foram introduzidos vários protocolos, que diferem entre si quanto ao tipo e concentração de crioprotetores, tempo de equilíbrio, taxas de resfriamento e dispositivos usados (Rienzi *et al.*, 2017).

No congelamento lento é utilizada uma solução hipertônica de crioprotetores permeáveis de baixo peso molecular para facilitar a desidratação parcial do embrião. Os embriões são resfriados lentamente (0,2 a 2,0°C/min) usando uma máquina de congelamento programável (Rienzi *et al.*, 2017), projetada para fornecer parâmetros de resfriamento precisos e consistentes e, em seguida, são transferidos para um

botijão de nitrogênio líquido (-196°C) (Almiñana; Cuello; 2015). É a técnica de escolha para a criopreservação de embriões produzidos *in vivo*.

A vitrificação foi relatada pela primeira vez por Rall e Fahy em 1985, e é definida como a solidificação de uma solução à base de água, formando um estado vítreo amorfo semelhante ao vidro, sem formação de cristais de gelo. A viscosidade dos meios de vitrificação irá depender das alterações dos crioprotetores da solução. A vitrificação pode ser alcançada usando altas taxas de resfriamento e alta concentração de crioprotetores (Fahy *et al.*, 1984) e tem duas principais vantagens em comparação ao congelamento lento: a não formação de gelo intracelular e a redução das lesões causadas pelas baixas temperaturas (Kasai; Mukaida, 2004).

Os estudos conduzidos nessa área tem demonstrado que a vitrificação induz menos alterações negativas no proteoma e metabolismo energético embrionário do que o congelamento lento (Varghese *et al.*, 2009), apesar da alta concentração de crioprotetores (necessária para atingir a viscosidade) e a rapidez no congelamento serem aspectos negativos da técnica, pois podem aumentar a toxicidade para o embrião e causar danos osmóticos (Liebermann *et al.*, 2002). Os aspectos positivos da vitrificação são o fato de ser uma técnica muito mais rápida e simples do que o congelamento lento, por não necessitar de equipamento computadorizado, mas requer pessoal altamente treinado para manipular embriões em pequenos volumes e em curtos espaços de tempos (Almiñana; Cuello, 2015).

Ao contrário das diferenças existentes entre os protocolos de congelamento, os procedimentos de descongelamento e aquecimento entre as duas técnicas são muito semelhantes. Normalmente, os embriões são removidos do nitrogênio líquido e colocados em soluções com concentrações decrescentes de sacarose que fazem com que os crioprotetores sejam eliminados, produzindo assim, um gradiente osmótico (Almiñana; Cuello, 2015).

Em relação às hastes de congelamento, enquanto no congelamento lento são, normalmente, de 0,25 mL (Arav, 2014) as hastes de vitrificação são constantemente aperfeiçoadas, de modo a ser necessário o mínimo de volume de meio de vitrificação, sendo recomendado, não ultrapassar 1 µL.

Dentre as alterações a nível celular, os processos de criopreservação (tanto o congelamento lento como a vitrificação) podem causar choque térmico e alterações morfológicas no embrião, além de mudanças ultraestruturais, alterações mitocondriais (Zander-Fox *et al.*, 2013), aumento da fragmentação do DNA (Kader *et al.*, 2009) e

alteração na expressão gênica (Shaw *et al.*, 2012). Grande parte dessas alterações estão relacionadas à homeostase, metabolismo, regulação das atividades celulares e fisiológicas (Stokes *et al.*, 2007).

Apesar da vitrificação ser o método mais eficiente para o congelamento de embriões bovinos oriundos de fertilização *in vitro*, devido à algumas peculiaridades, principalmente, nos protocolos de reaquecimento, a técnica ainda apresenta não apresenta taxas de criosobrevivência excelentes. Uma estratégia que tem sido usada para otimizar os resultados de vitrificação de embriões PIV é a delipidação parcial. No entanto, compreender o comportamento dos lipídios durante o resfriamento e congelamento, em particular as transições de fase lipídica, é fundamental para uma criopreservação bem-sucedida (Amstislavsky *et al.*, 2019).

1.5.3 Fatores que afetam a criotolerância de embriões bovinos

Atualmente, os critérios mais utilizados para avaliar a viabilidade de um embrião à técnica de criopreservação são o estágio de desenvolvimento e grau de qualidade (Marsico *et al.*, 2019). Características como blastômeros desagregados, crescimento lento, alto teor de lipídios, sensibilidade térmica e apoptose são características que tornam os embriões PIV mais sensíveis à criopreservação do que aqueles produzidos *in vivo* (Mucci *et al.*, 2006; Barcelo-Fimbres; Seidel, 2007; Sudano *et al.*, 2011).

Pode-se dizer que a eficiência de qualquer protocolo de criopreservação é afetada principalmente pela espécie, a qualidade, o tamanho e a origem do embrião (*in vivo* ou *in vitro*), a quantidade de água intracelular, o conteúdo lipídico e a permeabilidade da membrana (Almiñana; Cuello, 2015). Esses fatores variam não apenas entre as espécies, mas também entre os diferentes estágios de desenvolvimento da mesma espécie (Dalcin; Lucci, 2010). Também é consenso entre vários autores que o sucesso das criopreservação depende de alguns fatores como: técnica de escolha (congelamento lento ou vitrificação), tipo de crioprotetor (permeável ou impermeável); condições de congelamento/resfriamento (tempo de exposição, temperatura das soluções) e a experiência do técnico que está realizando o procedimento (Marsico *et al.*, 2019).

As dificuldades na criopreservação de oócitos e embriões com alto teor de lipídios já são conhecidas há mais de 40 anos (Polge, 1977) e ainda são uma limitação importante em muitas espécies de mamíferos (Dobrinsky, 2001; Romao *et al.*, 2015). Apesar disso, sabe-se que, na composição e quantidades adequadas, os lipídios são responsáveis pelo fornecimento energético dentro de qualquer célula. Esse aporte energético, dependente dos lipídeos oocitários, é imprescindível para o adequado desenvolvimento embrionário, durante as primeiras clivagens (Sturmey *et al.*, 2009, Dunning *et al.*, 2014).

Sudano *et al.* (2012) realizaram estudo com duas subespécies (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) e duas origens (PIV e TE) e observaram que embriões Simental (taurinos) apresentaram maior sobrevivência após a vitrificação que embriões Nelore (zebuínos), apesar do maior conteúdo lipídico. Além disso, o perfil de lipídeos de membrana do tipo fosfolípidos (PC) e esfingomielinas foi característico para cada grupo, sugerindo marcadores lipídicos positivos [PC (34:2) e PC (36:5)] e negativos [PC (32:0) e PC (34:1)] da criotolerância embrionária.

Segundo o trabalho de Amstislavsky *et al.* (2019), a transição de fase lipídica, fenômeno físico que engloba os estados de ordenamento e conformação das estruturas lipídicas em temperaturas de resfriamento abaixo da temperatura ideal, seja a principal causa de danos celulares durante a criopreservação em embriões de mamíferos.

A transição de fase lipídica pode alterar e perturbar os processos intracelulares e causar redistribuição de fosfolípidos nas membranas, resultando em danos celulares (Quinn, 1985). Os lipídios presentes nas membranas biológicas, incluindo a superfície de gotículas lipídicas, geralmente estão na fase líquida (estado fluido) em temperaturas fisiológicas, e sua alta elasticidade impede a ruptura da membrana (Lee *et al.*, 2001). Em baixas temperaturas, supõe-se que as membranas celulares passem para fase semelhantes à sólida, na qual as membranas se tornam mais rígidas e a taxa de difusão de moléculas hidrofóbicas, assim como a permeabilidade das membranas, diminui consideravelmente (Amstislavsky *et al.*, 2019).

As temperaturas relacionadas à fase de transição lipídica correlacionam-se com o grau de saturação lipídica dos oócitos. Oócitos e embriões ricos em lipídios insaturados, como ocorre em camundongos e gatos, passam pela fase de transição lipídica em temperaturas mais baixas (Okotrub *et al.*, 2017) do que aqueles que contêm proporções maiores de lipídios saturados, como bovinos (Zeron *et al.*, 2001)

ou ovinos (Zeron *et al.*, 2002). A ocorrência da fase de transição lipídica, em temperaturas mais baixas, pode explicar as melhores taxas de sucesso no congelamento de embriões de camundongos (Igonina *et al.*, 2016) e de gatos domésticos (Pope, 2014), em comparação com bovinos, apesar da maior quantidade de lipídios nos embriões destas espécies.

A relação negativa existente entre o excesso de lipídeos na PIVE e a criotolerância embrionária, juntamente aos problemas causados por elevada concentração de ERO, são os motivos pelos quais tem se estudado o acúmulo lipídico em oócitos e embriões produzidos *in vitro*.

Evidências indicam que o excesso de ERO na PIVE induz o bloqueio do desenvolvimento e compromete a viabilidade oocitária e embrionária. Estes comprometimentos ocorrem devido às lesões estruturais e funcionais promovidas pelo contato dos radicais livres com os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) presentes nos oócitos e embriões (Wang *et al.*, 2002), desencadeando o processo de peroxidação lipídica.

Os meios de cultivo são um fator determinante na produção, qualidade e criosobrevivência dos blastocistos produzidos *in vitro*. Apesar de todo conhecimento gerado em relação aos sistemas de produção *in vitro* nas últimas décadas, ainda são necessárias melhorias na eficiência no processo (Marsico *et al.*, 2019).

Na figura 6 são apresentados alguns eventos celulares e moleculares necessários na aquisição de competência para o desenvolvimento embrionário, demonstrando seu impacto na criosobrevivência.

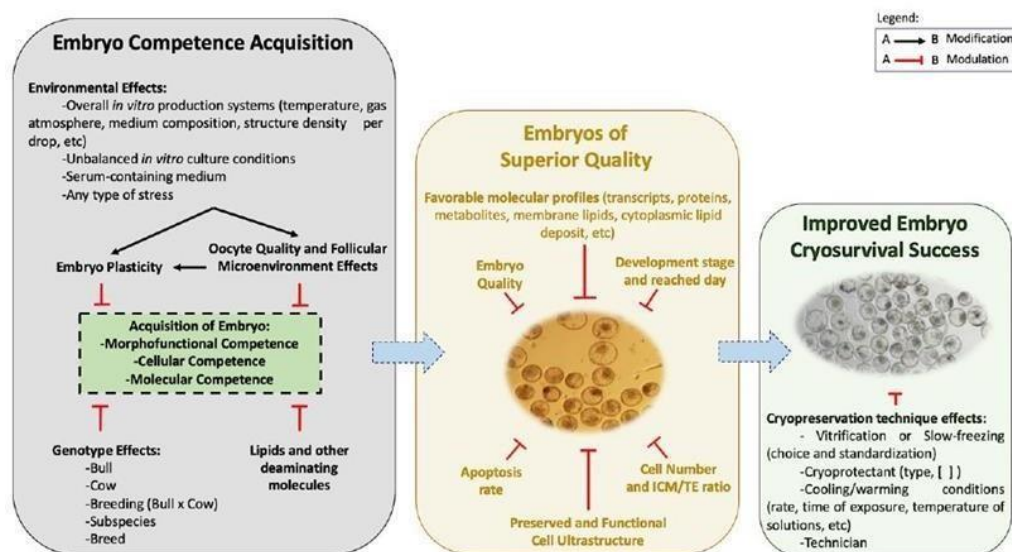


Figura 6: Fatores envolvidos no sucesso da criopreservação. Etapas interconectadas (setas tracejadas azuis, da esquerda para a direita) indicando elementos envolvidos na competência embrionária para a geração de embriões de qualidade superior e aumento do sucesso na criopreservação. Fonte: Marsico et.al. 2019.

1.5.4 Diferentes abordagens para otimizar a criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*

Com o intuito de otimizar a criosobrevivência embrionária, duas estratégias tem sido propostas: 1) Melhorias das técnicas de criopreservação existentes e 2) modificação da composição molecular dos embriões durante o cultivo *in vitro*, a fim de torná-los mais criotolerantes (Seidel, 2006, Gómez *et al.*, 2009).

De acordo com Jin e Mazur (2015), a eficiência da vitrificação depende mais do grau de desidratação (controle osmótico) celular e da taxa de reaquecimento do que dos tipos de crioprotetores utilizados.

A transferência direta, um método usado desde os anos 90, para simplificar a etapa de reidratação pós-descongelamento de embriões *in vivo*, tem se mostrado uma alternativa útil para uso comercial também em embriões PIV, pois elimina a etapa de remoção dos crioprotetores e a avaliação embrionária antes da transferência, sendo, portanto, mais prática que o descongelamento convencional (Sanchez *et al.*, 2017). Esse método tem apresentado resultados promissores, e tem sido implementada em

larga escala, principalmente nos EUA e no Brasil (Sanches *et al.*, 2019), com ampla aplicação no congelamento de embriões à campo.

Visando superar essas dificuldades durante o reaquecimento dos embriões, Oliveira e colaboradores (2020) desenvolveram um protocolo de aquecimento integrado com o aparato de vitrificação para transferência direta de embriões, sem as etapas de gradiente de sacarose e avaliação embrionária (Oliveira *et al.*, 2020). Um dos protocolos testados pelo grupo aumentou significativamente a sobrevivência embrionária (taxa de expansão 95.0% vs 83.1% e taxa de eclosão 74.2% vs 51.5%) quando comparado ao reaquecimento convencional. A qualidade embrionária também aumentou, o observável através da contagem do número total de células.

A vitrificação é um método superior para a criopreservação de embriões de FIV, mas devido aos protocolos complicados de descongelamento, não é comumente utilizado na rotina de laboratórios comerciais (Oliveira *et al.*, 2020). Visando superar essas dificuldades durante o reaquecimento dos embriões, Oliveira e colaboradores (2020) desenvolveram um protocolo de descongelamento dentro da própria pipeta, compatível com a maioria dos dispositivos de vitrificação para transferência de embriões, sem a necessidade de etapas de gradiente de sacarose e avaliação do embrião. Um dos protocolos testados pelo grupo aumentou significativamente a sobrevivência embrionária (taxa de expansão 95.0% vs 83.1% e taxa de eclosão 74.2% vs 51.5%) quando comparado ao reaquecimento convencional.

A qualidade embrionária também aumentou, o observável através da contagem do número total de células. A partir dos resultados obtidos, o grupo concluiu que o protocolo de transferência direta proposto é prático e eficaz e pode ser usado no aquecimento de embriões criopreservados produzidos *in vivo*, em substituição ao congelamento lento, a fim de otimizar as taxas e a qualidade dos embriões produzidos a campo.

No entanto, apesar do grande esforço da comunidade científica em propor melhorias nas técnicas de criopreservação, a previsão quanto à criotolerância do embrião permanece incerta e subjetiva (Sudano *et al.*, 2012; Almiñana; Cuello, 2015) e a eficiência geral do processo permanece baixa (Sanches *et al.*, 2019).

Em relação à composição molecular, é evidente a importância da análise comportamento lipídico dos embriões PIV, sendo essa, uma questão crucial para o sucesso da criopreservação embrionária (Sanches *et al.*, 2013).

A utilização de abordagens multidisciplinares, como espectroscopia e microscopia, pode ajudar a compreender os mecanismos que causam danos durante a criopreservação. Além disso, essas técnicas podem fornecer uma base teórica que possibilite modificações moleculares mais precisas em oócitos e embriões (Amstislavsky *et al.*, 2019), o que pode levar a melhores resultados de sobrevivência após a criopreservação.

1.6 NANOBIOTECNOLOGIA

A nanotecnologia representa um campo recente e dinâmico de pesquisa, que se concentra na síntese e caracterização de materiais em escala nanométrica, e explorando suas diversas aplicações (Isaac *et al.*, 2017). Alguns pesquisadores consideram que o interesse por essa área da ciência cresceu a partir de 1959, após Richard Feynman, um físico americano, afirmar que seria possível construir estruturas de tamanhos nanométricos por meio da manipulação de átomos (Haque, 2019).

A nanotecnologia engloba um conjunto de técnicas utilizadas para manipular a matéria em escala atômica e molecular, com o intuito de criar estruturas com tamanho entre 1 nm e 100 nm (Bayda *et al.*, 2019). Nessa escala, os materiais manifestam propriedades físico-químicas diferentes daquelas observadas nas escala micro e macro, principalmente relacionadas à condutividade elétrica, elasticidade e maior resistência mecânica (Rasmussen *et al.*, 2018).

A palavra "Nano" é derivada do termo em latim, que significa "anão". O tamanho nano, especificamente 10^{-9} , significa a bilionésima parte de uma unidade específica, portanto, um nanômetro é igual a 10^{-9} metros ($1\text{n} = 10^{-9}\text{ m}$) (Boholm, M; Boholm, A., 2012).

No Brasil, a nanotecnologia é considerado um dos setores estratégicos para o governo. De acordo com uma pesquisa recente, o país registrou um crescimento anual de 13% nas publicações científicas sobre nanotecnologia no período entre 2000 e 2018, sendo as melhores universidades brasileiras líderes de projetos nesse setor (Bakker *et al.*, 2019).

A nanotecnologia pode ser empregada nas mais diversas áreas de pesquisa e ciência, tais como engenharia, biologia, eletrônica, química, física, informática,

medicina, agricultura, ciência dos materiais, energia (Kumar *et al.*, 2023) (Figura 7).

A nanobiotecnologia é um campo que se concentra na síntese e caracterização de biomateriais em escala nanométrica e explora suas diversas aplicações. Uma das mais exploradas que tem despertado grande interesse de pesquisa ao longo da última década, é o uso de nanopartículas como transportadoras de moléculas químicas e biológicas para as células (Kumar *et al.*, 2023). Pesquisadores na área de reprodução animal também identificaram que esses nanomateriais podem ser utilizados para transferir genes exógenos, especialmente no contexto da produção de animais geneticamente modificados, apresentando algumas vantagens em relação aos métodos convencionais (Quintão *et al.*, 2022).

A nanobiotecnologia refere-se, portanto, à integração entre a nanotecnologia e a biologia (Pina *et al.*, 2006) para aplicações em áreas como medicina, agricultura e meio ambiente. Essa interseção pode abranger descoberta de novas drogas e tratamentos médicos, ferramentas de diagnóstico, medicamentos e novos biomateriais (Paull *et al.*, 2003).

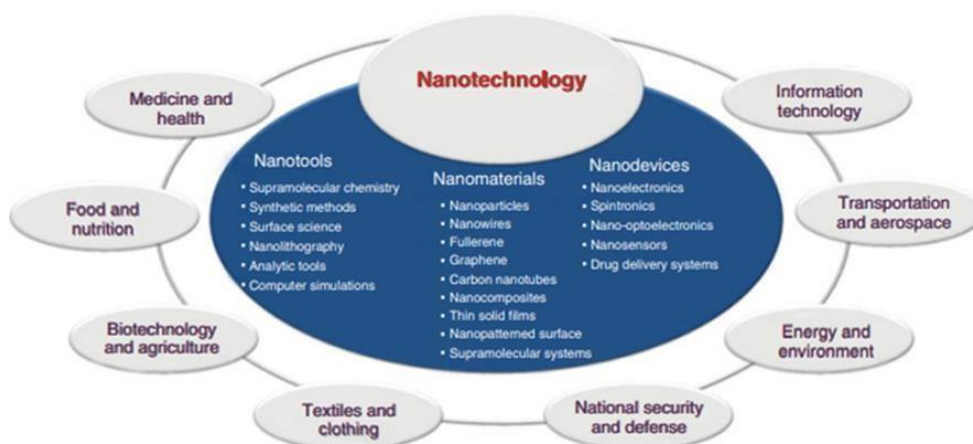


Figura 7: Presença da Nanotecnologia em diversos setores da economia. Fonte: Kumar *et al.* 2023.

1.6.1 Nanopartículas de óxido de zinco (NPZNOs)

O zinco (Zn) foi considerado um mineral essencial para a saúde humana em 1963 (Prasad *et al.*, 1963) e é encontrado em altas concentrações no fígado, ossos, rins e músculos (Schell; Kornegay; 1996), onde funciona como constituinte de inúmeras metaloenzimas (Hambidge *et al.*, 1986). É um micronutriente essencial, com um papel significativo no crescimento, desenvolvimento e reprodução de mamíferos. No sistema reprodutor masculino, o zinco é importante para o desenvolvimento testicular e esteroidogênese (Hamdi *et al.*, 1997), reação acrossomal (Riffo *et al.*, 1992) e estabilização da cromatina dos espermatozoides (Kvist *et al.*, 1990). A deficiência materna de zinco pode resultar em teratogênese fetal, gestação prolongada e baixo peso da prole ao nascer (Favier, 1992), de modo que o zinco também influencia a sobrevivência embrionária e fetal (Davis Mertz, 1987). Além disso também está envolvido na formação de prostaglandinas, pois está na estrutura de determinadas enzimas que controlam a cascata do ácido araquidônico (Wauben *et al.*, 1999).

Através da estabilização dos domínios dedos de zinco (zinc finger), domínios protéicos que se ligam ao DNA, RNA e proteínas, o zinco torna-se importante em vários processos celulares, como regulação transcricional, transdução de sinal, reparo de DNA e migração celular (Cassandri *et al.*, 2017).

As principais vantagens do uso das NPZNOs em comparação com as partículas não-nanoestruturadas, é que as primeiras apresentam maior resistência térmica, robustez e uma vida útil mais longa (Zhang *et al.*, 2007). As NPZNOs funcionalizadas ou não, são resistentes ao calor e à radiação, o que contribui para suas vastas aplicações biológicas (Lin; Xing, 2007). Ainda, segundo Dawei *et al.* (2009), os pesquisadores preferem utilizar o zinco na forma de nanopartículas devido à sua alta biodisponibilidade, baixa toxicidade e ao alto potencial para alcançar a célula-alvo (Dawei *et al.*, 2009).

As NPZNOs podem penetrar a membrana celular mediante quatro mecanismos distintos: 1) receptores associados às proteínas efetoras ativam vias de sinalização celular; 2) canais iônicos presentes na membrana mitocondrial e membrana celular facilitam a entrada das nanopartículas no citoplasma; 3) endocitose, onde um fragmento da membrana lipídica celular envolve as NPZNOs, formando vacúolos que mais tarde se fundem com as membranas de outras organelas, como o núcleo e a mitocôndria; 4) absorção direta, no qual as NPZNOs, dependendo de seu tamanho e forma, penetram na bicamada lipídica celular (Patrón-Romero, *et al.*, 2022).

No trabalho de Rasmussen *et al.* (2010), as NPZNOs mostraram um papel promissor na destruição seletiva de células tumorais, devido à maior capacidade de interação com as células, e, portanto, maior eficiência biológica em comparação com as partículas não nanoestruturadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Kotdawala e colaboradores (2012), que verificaram que a suplementação com 100 mM zinco antes da criopreservação reduziu o dano mitocondrial tanto em amostras de sêmen normozoospermicas como amostras anormais.

Kumaran e colaboradores (2016) também não observaram nenhum efeito tóxico significativo das NPZNOs monodispersas em linhagens celulares humanas, o que levou os autores a sugerirem sua aplicação na nanomedicina.

Em geral, ainda que os mecanismos de risco e grau de toxicidade da nanopartículas não estejam completamente esclarecidos, suas propriedades antibacterianas, resistência ao calor e à luz UV as tornam amplamente utilizadas em diversas aplicações, como na composição de cosméticos e protetores solares, aditivos alimentares, embalagens, fungicidas na agricultura e biomedicina (Hong *et al.*, 2014).

No estudo de Isaac *et al.* (2017), o objetivo era verificar se as NPZNOs teriam um efeito benéfico na criopreservação do sêmen humano. Comparando as NPZNOs com partículas não-nanoestruturadas, foi observada a prevenção de danos ao DNA e uma maior estabilização da cromatina do espermatozoide no grupo tratado com as nanopartículas. Apesar dos espermatozoides possuírem uma alta quantidade de ácidos graxos insaturados na membrana plasmática e serem mais propensos ao dano oxidativo, a prévia incubação do sêmen com as NPZNOs mostrou melhores resultados da criopreservação, especialmente em relação à integridade da cromatina, sem causar efeitos adversos em sua competência funcional. O efeito protetor das NPZNOs na cromatina foi atribuído à possível formação de uma camada protetora ao redor dos espermatozoides, que poderia impedir ou minimizar a peroxidação lipídica na membrana plasmática. A conclusão dos autores foi que a menor concentração de malondialdeído (MDA), marcador de estresse oxidativo, no grupo tratado com NPZNOs, sugere que as nanopartículas possuem um efeito antioxidante protetor durante o processo de congelamento e reaquecimento dos espermatozoides. Neste trabalho não foi observado nenhum grau de toxicidade, que está geralmente relacionado ao tamanho médio da partícula.

1.6.2 NPZNOs no desenvolvimento embrionário *in vitro*

O emprego da nanotecnologia em estudos na área reprodutiva, tem crescido nas últimas décadas, especialmente nas técnicas envolvidas na PIVE de bovinos e búfalos. As propriedades físicas únicas das nanopartículas, como tamanho reduzido, maior área de superfície, estabilidade e métodos de caracterização bem definidos, são algumas vantagens dos nanomateriais em relação às partículas não nanoestruturadas (Albanese *et al.*, 2012).

Estudos envolvendo a suplementação de partículas de NPZNOs na MIV de oócitos bovinos tem demonstrado aumento nas taxas desenvolvimento embrionário *in vitro* (Picco *et al.*, 2010; Abdel-Halim; Helmy, 2017). Uma possível explicação é a função do zinco como cofator de algumas enzimas importantes durante o desenvolvimento embrionário inicial (Kambe *et al.*, 2008; Picco *et al.*, 2010,) e seu papel antioxidante de componentes celulares (Abdel-Halim *et al.*, 2018).

O zinco é um micronutriente requerido para ação de 200 metaloenzimas. Ele desempenha um papel vital no crescimento e desenvolvimento do corpo humano (KAJI, 2001) e auxilia na estabilização do DNA e do RNA (Kotdawala, *et al.*, 2012), tendo um papel importante em várias funções bioquímicas e fisiológicas (Shankar Prasad, 1998).

No estudo de Halim e colaboradores (2018), foram investigadas diferentes concentrações de NPZNOs adicionadas na MIV de oócitos bovinos: 0,4 µg/mL, 0,7 µg/mL, 1,0 µg/mL e 1,5 µg/mL. Os resultados mostraram que as concentrações de 0,7 µg/mL e 1,0 µg/mL de NPZNOs causaram menor dano ao DNA dos oócitos em comparação com o grupo controle. A suplementação do meio MIV com 1,5 µg/mL de NPZNOs resultou em uma redução significativa na taxa de clivagem, enquanto nas concentrações de 0,7 µg/mL e 1,0 µg/mL, não houve diferença na taxa de clivagem, mas ocorreu um aumento significativo na taxa de formação de blastocistos, em comparação com o grupo controle. No mesmo estudo, os autores também observaram um efeito antioxidante das nanopartículas, e concentrações mais elevadas de zinco, em sua forma não nanoestruturada, foram tóxicas e causaram desequilíbrio redox.

Resultados semelhantes foram encontrados por Abdel-Halim e Helmy (2017), onde os autores avaliaram os efeitos de NPZNOs na MIV de oócitos bovinos, assim

como os danos causados ao DNA das células do cúmulus, concentração de glutathione (GSH), desenvolvimento embrionário e reexpansão de blastocistos aquecidos, após a vitrificação. Como resultados, relataram que a suplementação do meio de maturação com as nanopartículas na concentração de 1µg/mL reduziu os danos ao DNA nas células do cúmulus e aumentou as taxas de maturação oocitária. Os autores também observaram uma maior re-expansão após o reaquecimento de blastocistosvitrificados, no grupo no qual as nanopartículas de óxido de zinco foram adicionadas ao meio de vitrificação com o etilenoglicol.

De uma forma geral, há alguns relatos sobre a toxicidade das NPZNOs em determinadas linhagens celulares (Miller *et al.*, 2010; Sinha *et al.*, 2011), mas ainda são poucas informações disponíveis sobre o efeito das mesmas na reprodução e desenvolvimento de mamíferos.

1.6.3 Atividade antioxidante de NPZNOs

As espécies reativas de oxigênio são produzidas e encontradas em todos os sistemas biológicos (Luz *et al.*, 2011). Elas são geradas de forma fisiológica durante a respiração celular, quando o oxigênio molecular é reduzido por elétrons liberados formando o superóxido O_2^- . A partir daí o superóxido pode ser derivado em outras moléculas como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (Del Collado *et al.*, 2017). Essas espécies reativas são radicais, isto é, moléculas com um ou mais elétrons não emparelhados que acabam danificando biomoléculas por oxidação. O perigo desse tipo de reação é que os produtos de oxidação formados são os próprios radicais, que, em muitos casos, são capazes de propagar a reação, levando a danos celulares extensos (Jayaprakasha *et al.*, 2001).

Estudos sugerem que o estado redox da célula pode interferir em diversos eventos celulares como apoptose e necrose, além de promover a oxidação de aminoácidos, ácidos nucleicos e ácidos graxos, principalmente os poli-insaturados presentes na membrana das células (Hosseini *et al.*, 2009). A reação das ERO com os ácidos graxos poliinsaturados inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse celular oxidativo (Lima; Abdalla, 2001).

A lipoperoxidação provoca alterações na estrutura e permeabilidade das membranas celulares, ricas em AGPI, aumentando, por exemplo, sua permeabilidade aos íons cálcio (Luz *et al.*, 2011, Ispada *et al.*, 2018). A fluidez da membrana plasmática está relacionada à presença de cadeias insaturadas dos fosfolipídios e de colesterol e danos a esta camada lipídica tendem a alterar as propriedades da membrana.

O processo de lipoperoxidação se inicia com o sequestro de um átomo de hidrogênio dos AGPI pelas ERO. Por ser mais instável e reativo, o radical hidroxila (OH) é considerado o agente desencadeador da reação. Como consequência, há formação de radicais lipídicos alquila (L \cdot), que rapidamente reagem com uma molécula de oxigênio (O_2) formando os radicais peroxila (LOO \cdot). Estes, por sua vez, para se estabilizarem, abstraem átomos de hidrogênio dos AGPI, resultando na formação de novos radicais lipídicos. Esta reação em cadeia se propaga até os radicais lipídicos destruírem a si próprios (Crocomo *et al.*, 2012).

Assim, vários produtos de peroxidação lipídica da membrana plasmática são formados a partir da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, como consequência do estresse oxidativo (Kumar *et al.*, 2013) (Figura 8). O estresse oxidativo é um termo que denota um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e o respectivo sistema de defesa de um organismo (Pandey *et al.*, 2012) sendo as ERO, as principais substâncias oxidantes.

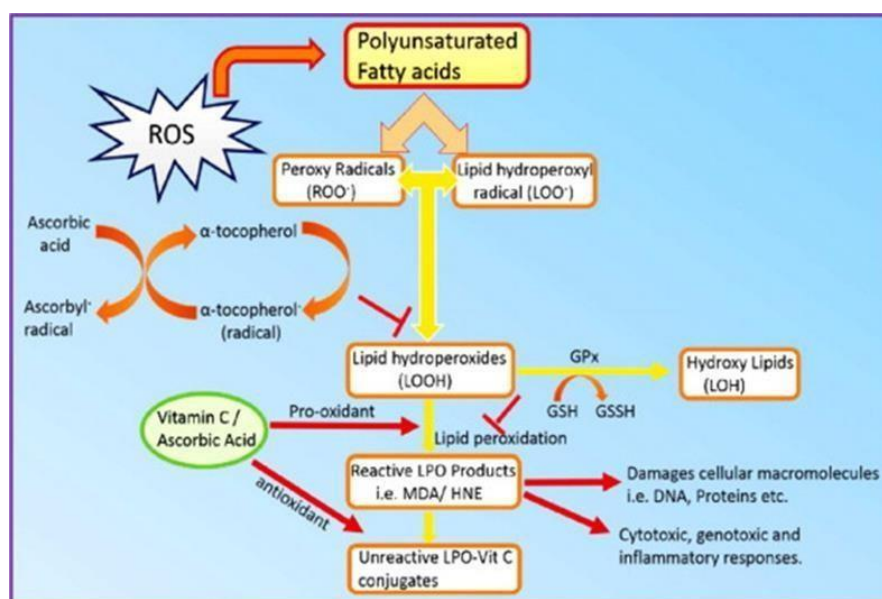


Figura 8. Apresentação esquemática da reação em cadeia da peroxidação lipídica mediada por ERO (ROS). A figura também mostra a formação de radicais peróxil lipídicos altamente reativos (LPO), como malondialdeído (MDA) e 4-hidroxi-2 (E) - nonenal (4HNE); bem como a influência de determinados antioxidantes (ácido ascórbico e alfa-tocoferol) nas reações em cadeia. O LPO tóxico, pode danificar as macromoléculas (DNA, RNA, proteínas) e pode iniciar reações citotóxicas, genotóxicas e inflamatórias. (Bala, M. 2014).

No trabalho de Sanjay e colaboradores (2014), investigou-se a atividade lipoprotetora das NPZNOs em 'mistura' de tecidos (fígado, cérebro, rim e baço) de ratos Wistar. Avanços significativos na redução dos danos causados pelos radicais livres foram obtidos no grupo tratado com nanopartículas, na concentração de 600 µg/ml. Uma das explicações encontrada pelos autores foi que as nanopartículas possuem ligações instáveis que trazem imperfeições em sua estrutura cristalina, e, devido ao maior distúrbio estrutural, mais íons intersticiais de zinco se dissolvem e interagem com as células. Como os elétrons no estado excitado são altamente energéticos, imediatamente se combinam com os radicais livres. Assim, ao eliminar as ERO, as

NPZNOs podem proteger as células dos efeitos deletérios do estresse oxidativo (Sanjay *et al* 2014).

O estudo de Khaliq *et al.* (2023) constatou que as NPZNOs tiveram um efeito positivo na qualidade e fertilidade de espermatozoides de bodes da raça Beetal. Os autores sugerem que esse resultado pode ser atribuído às propriedades antioxidantes das NPZNOs que, na concentração de 1,0 µg/ml, aumentou a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) glutationa peroxidase (GSH), enquanto reduziu os marcadores de estresse oxidativo. Efeito contrário foi observado na dose de 2,0 µg/ml. Nessa concentração, as nanopartículas apresentaram efeito tóxico, com efeitos negativos sobre a qualidade e fertilidade do sêmen, após o descongelamento. Esses resultados corroboram com o que já foi dito anteriormente, sobre a toxicidade das NPZNOs ser dose dependente.

Dessa forma, as NPZNOs podem desempenhar um papel importante quando adicionada nos meios de produção *in vitro* de embriões bovinos, pois, devido às suas propriedades antioxidantes, elas têm a capacidade de reagir com os radicais livres e neutralizá-los, evitando assim os danos oxidativos às membranas celulares. Isso ajuda a preservar a integridade das células e protege os embriões contra o estresse oxidativo causado pela lipoperoxidação. Assim, as NPZNOs podem contribuir para manter a viabilidade e a saúde celular dos embriões bovinos, favorecendo um melhor desenvolvimento e aumentando as chances de sucesso em técnicas de reprodução assistida, como a criopreservação.

1.7 IMPORTÂNCIA DAS MITOCÔNDRIAS NO METABOLISMO EMBRIONÁRIO

As mitocôndrias são organelas multifuncionais que desempenham um papel fundamental na homeostase celular. Elas integram redes de sinalização e ativam uma resposta adaptativa ao estresse, fornecendo a energia necessária para a sobrevivência das células (Gualtieri *et al.*, 2021) em processos fisiológicos e patológicos (May-Panloup *et al.*, 2021; Tatone; Di Emidio, 2022). No entanto, fatores iatrogênicos, inerentes às tecnologias de reprodução assistida, podem afetar sua competência funcional, resultando em um resultado reprodutivo anormal (Gualtieri *et al.*, 2021).

A produção de ATP, via fosforilação oxidativa, é necessária para vários eventos importantes, como a maturação, montagem do fuso meiótico, extrusão do corpúsculo polar, segregação cromossômica, fertilização e desenvolvimento embrionário (Dumollard *et al.*, 2007; Van Blerkom, 2009). Acredita-se que as mitocôndrias de origem oocitária sejam responsáveis pelo suprimento de energia durante o desenvolvimento inicial, uma vez que não há síntese de novas organelas até o estágio de blastocisto (Van Blerkom, 2011).

As mitocôndrias são responsáveis também pela geração de ERO, homeostase de íons de cálcio (Ca^{2+}) e mecanismos envolvidos na necrose e apoptose celular. Tanto o Ca^{2+} como as ERO atuam como segundos mensageiros na sinalização celular e interagem entre si, bidirecionalmente (Gualtieri *et al.*, 2021). Diversos estudos (Van Blerkom *et al.*, 1995; Ducibella, *et al.*, 2002; Ozil *et al.*, 2006) afirmam que uma disfunção mitocondrial nos oócitos pode provocar interrupção do desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Tal afirmativa pode ser justificada pelo fato dos cofatores metabólicos produzidos pelo metabolismo mitocondrial, assim como as ERO, derivadas da cadeia respiratória mitocondrial, serem essenciais para a reprogramação epigenética e a regulação da sinalização celular no embrião (May-Panloup *et al.* 2021). No entanto, as ERO podem ser tóxicas, caso se acumulem no organismo (Shadel; Horvath, 2015).

Assim, a mitocôndria está no centro da regulação da homeostase metabólica do embrião por meio da modulação e disponibilidade de metabólitos e do equilíbrio do estado redox (Cagnone; Sirard, 2016). Esse equilíbrio depende da relação entre algumas moléculas presentes na célula, sendo as mais importantes: glutatona reduzida/oxidada (GSH/GSSG), dinucleotídeo de adenina de nicotinamida reduzida/oxidada (NADH/NAD⁺) e dinucleotídeo de adenina de nicotinamida defosfato reduzida/oxidada (NADPH/NADP⁺) (May-Panloup *et al.* 2021). Por exemplo, o nível de glutatona aumenta após a ativação do desenvolvimento embrionário e vai reduzindo, progressivamente, até o estágio de blastocisto (Luberda, 2005). Sabe-se que o aumento das concentrações intracelulares de glutatona reduzida, especialmente durante a maturação oocitária está associado a uma melhoria na fertilização e desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* (De Matos; Furnus, 2000). O nível de glutatona aumenta após a ativação do desenvolvimento embrionário e vai reduzindo, progressivamente, até o estágio de blastocisto (Luberda, 2005).

Dada a importância das mitocôndrias, para o funcionamento de diversas funções celulares (figura 9) alguns pesquisadores têm considerado essa organela como um potencial biomarcador da competência oocitária e viabilidade embrionária (May-Panloup *et al.* 2021).

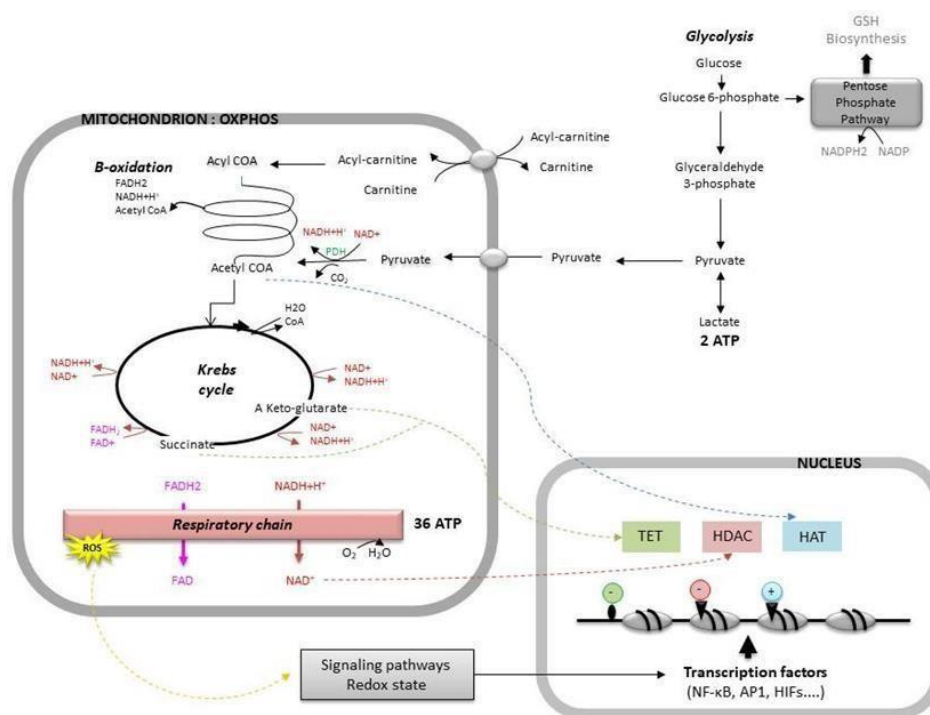


Figura 9. O papel das mitocôndrias no metabolismo celular, vias de sinalização e expressão gênica. A célula produz sua energia (ATP) por meio da fosforilação oxidativa ou por meio da glicólise anaeróbica. O embrião utiliza piruvato ou glicose como principal fonte de energia de acordo com seu estágio de desenvolvimento. A função mitocondrial produz metabólitos intermediários e espécies reativas de oxigênio (ROS) que estão envolvidos em vias de sinalização, homeostase redox e expressão gênica. Enzimas implicadas na regulação epigenética: TET (Ten eleven translocase), HDAC (histone deacetylase) e HAT (histone acetyltransferase). Fatores de transcrição: família κB (NF- κB), família de proteínas ativadoras-1 (AP1) e fatores de transcrição induzíveis por hipóxia (HIFs). GSH, glutatona; PDH, piruvato desidrogenase. Fonte: May-Panloup *et al.* 2021.

No entanto, embora seja amplamente reconhecida a importância da atividade mitocondrial em diversas funções celulares e em diferentes espécies (Tarazona *et al.*, 2006; Romek *et al.*, 2011), porém, a relação entre o uso de reguladores metabólicos, conteúdo lipídico, produção de radicais livres e o comportamento mitocondrial durante o estágio embrionário, ainda não foram investigados. Para uma melhor compreensão da relação entre todas essas variáveis, esses aspectos precisam ser avaliados.

1.8 ESTRESSE OXIDATIVO

1.8.1 Condições de cultivo *in vitro* e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)

A produção contínua e excessiva de ERO é uma das causas principais de baixa eficiência da produção embrionária *in vitro* em várias espécies animais. Isso ocorre devido às condições laboratoriais, que não provém todos os nutrientes necessários a um perfeito desenvolvimento embrionário, como ocorre *in vivo* (Sovernigo *et al.*, 2017; Agarwal, *et al.*, 2022).

A cadeia respiratória mitocondrial é o principal local de consumo de oxigênio na célula e a principal fonte de ERO (Mishra *et al.*, 2016). Assim, as ERO podem ser produzidas, intracelularmente, através do metabolismo de gametas e embriões, mas também podem ter sua produção aumentada, devido à fatores externos, associados às técnicas de reprodução assistida, como oxigênio atmosférico, incubadoras de CO₂, luz visível, temperatura, umidade, compostos orgânicos voláteis e em meios de cultivo. Sabe-se que os procedimentos de criopreservação e descongelamento são uma das principais fontes geradoras de radicais livres no ambiente *in vitro* (Agarwal *al.*, 2022). Alguns desses fatores estão representados na figura 10.

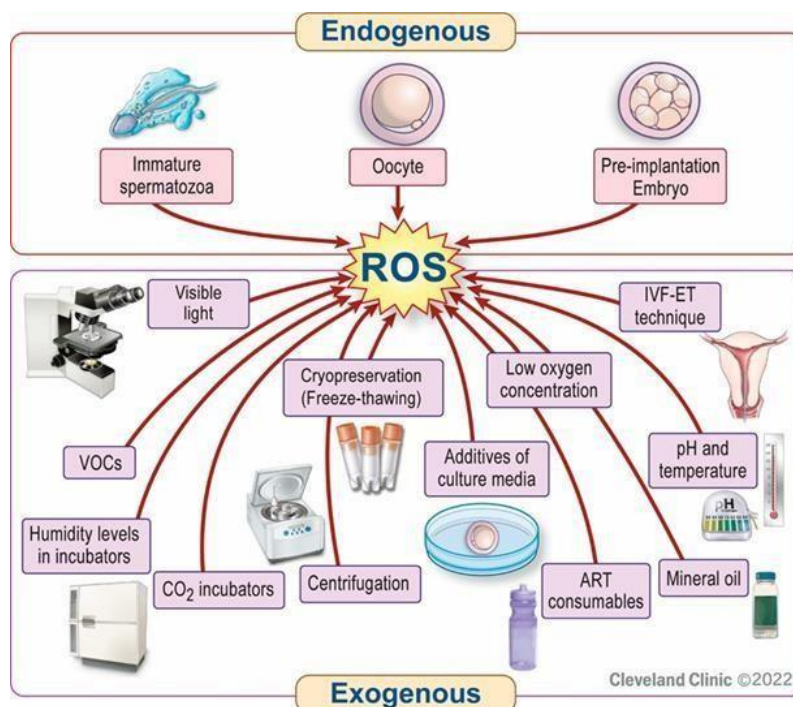


Figura 10: Fatores endógenos e exógenos que contribuem para a formação de ERO durante o cultivo embrionário *in vitro*. Fonte: Agarwal *et al.*, 2022.

Para reduzir o estresse oxidativo nas técnicas de reprodução assistida, é fundamental implementar um conjunto de estratégias (Agarwal *et al.*, 2006). Essas estratégias devem envolver um cuidadoso controle do ambiente laboratorial, assim como, otimização de meios de cultivo e das técnicas mais diretamente afetadas pelo aumento da produção de ERO, como preparo de espermatozoides e criopreservação. Os espermatozoides são altamente sensíveis à deterioração de suas membranas, ricas em ácidos graxos, quando expostos aos radicais livres presentes no ambiente *in vitro* (peroxidação lipídica). Da mesma forma, os lipídios embrionários, ao reagirem com os radicais livres presentes no ambiente *in vitro*, provocam alterações na membrana celular, impactando a taxa de sobrevivência dos embriões, após o processo de criopreservação. Assim, o incremento dos meios de maturação e cultivo com antioxidantes eficientes é fundamental para prevenir o estresse oxidativo e suas consequências prejudiciais nos resultados das técnicas de reprodução assistida.

1.8.2 Papel das espécies reativas de oxigênio no desenvolvimento embrionário *in vitro*

As espécies reativas de oxigênio produzidas fisiologicamente, em baixos níveis pelas células reprodutivas, são essenciais para a sinalização redox, e estão envolvidas na motilidade espermática, capacitação, reação acrossômica (Talevi *et al.*, 2007; Aitken, 2017), maturação oocitária, fertilização e desenvolvimento embrionário (Morado *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2018). No entanto, como são moléculas receptoras de elétrons, formam radicais livres (Harvey *et al.*, 2002), e podem contribuir para um ambiente de estresse oxidativo, quando sua produção supera o sistema antioxidante de defesa da célula (Gualtieri *et al.*, 2021).

Como consequência do estresse oxidativo *in vitro*, reações em cadeia são desencadeadas, promovendo danos celulares que resultam em altas taxas de apoptose e bloqueio da meiose oocitária e do desenvolvimento *in vitro*. Esses danos celulares incluem: peroxidação lipídica, alterações mitocondriais, desnaturação protéica, bloqueio no desenvolvimento embrionário, redução da motilidade espermática, alteração do fuso meiótico e depleção de ATP (figura 11) (Guérin *et al.*, 2001; Agarwal *et al.*, 2006).

Nesse contexto, muitos trabalhos são conduzidos no sentido de promover a suplementação dos meios de maturação e cultivo embrionário com reguladores metabólicos e moléculas com potencial antioxidante, capazes de realizar uma modulação lipídica (conteúdo e perfil lipídico), e reduzir a concentração de radicais livres nos meios. Esses efeitos impactam, positivamente, nos danos causados pela peroxidação lipídica e contribuem para aumentar as taxas desenvolvimento e de crio-sobrevivência de embriões *in vitro*.

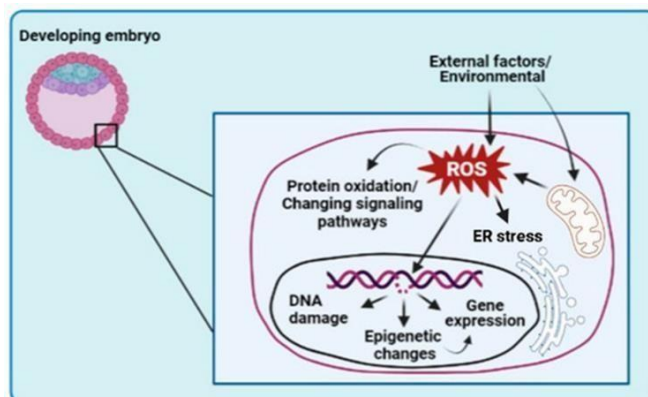


Figura 11: Efeito das espécies reativas de oxigênio nas células embrionárias. Fatores ambientais e mitocôndrias são fontes de geração de ERO. O excesso de ERO provoca alterações no DNA celular, estresse no retículo endoplasmático, perfil epigenético, degradação de proteínas, lipídios e comprometimento do desenvolvimento embrionário
Fonte: Marsico *et al.*, 2023.

1.9 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da adição, de diferentes concentrações de dois reguladores metabólicos e uma nanopartícula, no meio de maturação, visando determinar a estratégia mais eficaz para reduzir o conteúdo lipídico e o estresse oxidativo, a fim de otimizar o desenvolvimento pré implantacional e a criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

1.10 REFERÊNCIAS

AARDEMA, H. et al. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. *Biol. Reprod.*, v. 85, n. 1, p. 62-69, jan. 2011. DOI: 10.1095/BIOLREPROD.110.088815.

AARDEMA, H. et al. Bovine cumulus cells protect maturing oocytes from increased fatty acid levels by massive intracellular lipid storage. *Biol. Reprod.*, v. 88, n. 6, p. 164-1, jun. 2013.

ABE, H. et al. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 61, p. 57-66, 2002.

ABDEL-HALIM, B. R.; HELMY, N. A. Effect of nano-selenium and nano-zinc particles during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Animal Production Science*, v. 58, n. 11, p. 2021-2028, 2017.

ABDEL-HALIM, B. R.; MOSELHY, W. A.; HELMY, N. A. Developmental competence of bovine oocytes with increasing concentrations of nano-copper and nano-zinc particles during in vitro maturation. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, v. 7, n. 4, p. 161-166, 2018.

ACKERMAN, D.; SIMON, M. C. Hypoxia, lipids, and cancer: Surviving the harsh tumor microenvironment. *Trends Cell Biol.*, v. 24, p. 472-478, 2014. DOI: 10.1016/j.tcb.2014.06.001.

AGARWAL, A. et al. Estresse oxidativo em ambiente de técnicas de reprodução assistida. *Fertilidade e Esterilidade*, v. 86, n. 3, p. 503-512, 2006.

AGARWAL, A. et al. Oxidative stress and assisted reproduction: A comprehensive review of its pathophysiological role and strategies for optimizing embryo culture environment. *Antioxidants*, v. 11, n. 3, p. 477, 2022.

AITKEN, R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 84, p. 1039-1052, 2017. DOI: 10.1002/mrd.22871.

ALBANESE, A.; TANG, P. S.; CHAN, W. C. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu Rev Biomed Eng.*, v. 14, p. 1-16, 2012. DOI: 10.1146/annurev-bioeng-071811-150124. PMID: 22524388.

- ALI, J.; ALHARBI, N. H.; ALI, N. Chapter 1 Historical Background on Gamete and Embryo Cryopreservation. In: *Methods Mol. Biol.*, v. 1568, p. 3–20, 2017.
- ALMIÑANA, C.; CUELLO, C. What is new in the cryopreservation of embryos? *Anim. Reprod.*, v. 12, n. 3, p. 418-427, 2015.
- AMI, D. et al. FTIR spectral signatures of mouse antral oocytes: molecular markers of oocyte maturation and developmental competence. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1813, p. 1220–1229, 2011.
- AMSTISLAVSKY, S. et al. Influence of cellular lipids on cryopreservation of mammalian oocytes and preimplantation embryos: a review. *Biopreservation and Biobanking*, v. 17, n. 1, p. 76-83, 2019.
- ARAV, A. Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*, v. 81, n. 1, p. 96-102, 2014.
- ARIYAMA, H. et al. Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response. *J. Biol. Chem.*, v. 285, p. 22027–22035, 2010. DOI: 10.1074/jbc.M110.126870.
- AUCLAIR, S. et al. Absence of cumulus cells during in vitro maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. *J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 67, p. E599–E613, 2013.
- BAEK, J.; HE, C.; AFSHINNIA, F.; MICHAILEDIS, G.; PENNATHUR, S. Lipidomic approaches to dissect dysregulated lipid metabolism in kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*, v. 18, n. 1, p. 38-55, jan. 2022.
- BAKKER, E. J.; LEFERINK, B.; SMITS, P.; HOLLAND INNOVATION NETWORK BRAZIL. Nanotechnology innovation in Brazil – a macro analysis. The Hague: Netherlands Enterprise Agency, 2019. Disponível em: <http://www.rvo.nl/sites/default/files/2019/07/Nanotechnology-innovation-in-Brazil-a-macro-analysis.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2020.
- BALA, M. Ação concertada da via Nrf2-ARE, complexo MRN, HMGB1 e citocinas inflamatórias - implicação na modificação dos danos causados pela radiação. *Biologia Redox*, v. 2, p. 832-846, 2014.
- BARCELO-FIMBRES, M.; SEIDEL JR, G. E. Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation in vitro. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, v. 74, n. 11, p. 1406-1418, [mês e ano de publicação não informados].

- BARKAY, J.; ZUCKERMAN, H.; HEIMAN, M. A New, Practical Method of Freezing and Storing Human Sperm and a Preliminary Report on Its Use. *Fertil. Steril.*, v. 25, p. 399-406, 1974.
- BAYDA, S.; ADEEL, M.; TUCCINARDI, T.; CORDANI, M.; RIZZOLIO, F. The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules*, v. 25, n. 1, p. 112, 2019. Review.
- BEDAIWY, M. A.; FALCONE, T.; MOHAMED, M. S.; ALEEM, A. A.; SHARMA, R. K.; WORLEY, S. E.; ... & AGARWAL, A. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. *Fertility and Sterility*, v. 82, n. 3, p. 593-600, 2004.
- BEITZ, D. C. Metabolismo dos Lipídios. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. *Dukes: Fisiologia dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 398-429, 1996.
- BENEDUSI, Valeria. Lipidomics. *Materials and Methods*, v. 8, 10.13070/mm.en.8.2665, 2018.
- BERTEVELLO, P. S. et al. Lipid Identification and Transcriptional Analysis of Controlling Enzymes in Bovine Ovarian Follicle. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, p. 3261, 2018.
- BHAT, G. R. e SOFI, K. A. Preservação de oócitos e embriões em animais selvagens: uma atualização. *Crioletras*, v. 42, n. 5, p. 251-260, 2021.
- BICKEL, P. E.; TANSEY, J. T.; WELTE, M. A. PAT Proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1791, p. 419-440, 2009.
- BOHOLM, M.; BOHOLM, A. The many faces of nano in newspaper reporting. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 14, n. 2, p. 1-18, 2012.
- BONNEFONT, J.P. et al. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 25, p. 495-520, 2004.
- BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DONAWICK, W. J.; EVANS, J. F. Pregnancy following cow in vitro fertilization. *Biology of Reproduction*, v. 24, Suppl. 1, p. 175, 1981.
- BRAGA, José Victor et al. Abordagens para reduzir lipídios: uma revisão de seus impactos na produção in vitro de embriões. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 1, p. 3-7, 2019.

- BRUSENTSEV, E. Y.; MOKROUSOVA, V. I.; IGONINA, T. N.; ROZHKOVA, I. N.; AMSTISLAVSKY, S. Y. Role of lipid droplets in the development of oocytes and preimplantation embryos in mammals. *Russian Journal of Developmental Biology*, v. 50, p. 230-237, 2019.
- BURNUM, K. E. et al. Spatial and temporal alterations of phospholipids determined by mass spectrometry during mouse embryo implantation. *Journal of Lipid Research*, Bethesda, v. 50, n. 11, p. 2290-2298, 2009.
- CAGNONE, G.; SIRARD, M.-A. The Embryonic Stress Response to in vitro Culture: Insight from Genomic Analysis. *Reproduction*, v. 152, p. R247–R261, 2016.
- CAMPBELL, M.K.; FARREL, S.O. *Bioquímica. Bioquímica metabólica*, 5ª ed. São Paulo: Thomson Learning, 845 p., 2008.
- CARDOSO, C. J. T. *Metabolismo lipídico de oócitos e embriões bovinos - Efeitos da suplementação e da cinética de desenvolvimento*. 2020.
- CARRILLO-GONZÁLEZ, Diego F.; HERNÁNDEZ-HERRERA, Darwin Y.; MALDONADO-ESTRADA, Juan G. O papel da L-carnitina no metabolismo embrionário bovino: Uma revisão do efeito da suplementação com um modulador metabólico na produção in vitro de embriões. *Biotecnologia Animal*, v. 34, n. 2, p. 413-423, 2023.
- CASSANDRI, M. et al. Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discovery*, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2017.
- CHANKITISAKUL, V. et al. Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine in vitro matured oocytes. *Theriogenology*, v. 79, p. 590–598, 2013.
- CHARLIER, C. et al. Oocyte-somatic cells interactions, lessons from evolution. *BMC Genomics*, v. 13, p. 560, 2012.
- CHEN, M.; HUANG, J. The expanded role of fatty acid metabolism in cancer: new aspects and targets. *Precision Clinical Medicine*, v. 2, n. 3, p. 183-191, 2019.
- CHOUDHARY, K. K.; KAVYA, K. M.; JEROME, A.; SHARMA, R. K. Advances in reproductive biotechnologies. *Veterinary World*, v. 9, n. 4, p. 388-395, 2016.
- CHRISTIE, W.W. Simple and complex lipids: their occurrence, chemistry, and biochemistry. *Natural Product Reports*, v. 4, n. 2, p. 113-128, 1987.
- CLARKE, H.J. História, origem e função das projeções transzonais: as pontes de comunicação entre o oócito e seu ambiente. *Reprodução Animal*, v. 15, n. 3, p. 215, 2018.

- COBO, A.; DOMINGO, J.; PÉREZ, S.; CRESPO, J.; REMOHÍ, J.; PELLICER, A. Vitrification: An Effective New Approach to Oocyte Banking and Preserving Fertility in Cancer Patients. *Clinical and Translational Oncology*, v. 10, p. 268–273, 2008.
- CORREIA, P.A. Etossulfato de Fenazina na maturação in vitro de oócitos bovinos. 2019. 83f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal de Lavras.
- COSTA, C. B. et al. Influence of forskolin supplementation on embryos produced in vitro. *Livestock Science*, v. 221, p. 15–18, 2019.
- CROCOMO, L. F.; MARQUES FILHO, W. C.; ALVARENGA, F. D. C. L.; BICUDO, S. D. Produção de embriões in vitro: estresse oxidativo e antioxidante. *Veterinária e Zootecnia*, p. 470-479, 2012.
- CUMMINS, J. M. O papel das mitocôndrias no estabelecimento da competência funcional do oócito. *Journal of the European Society of Gynaecological Oncology*, v. S23-S29, 2004.
- D'SOUZA, F. et al. Spent embryo culture medium metabolites are related to the in vitro attachment ability of blastocysts. *Scientific Reports*, v. 8, p. 1-10, 2018.
- DALCIN, L.; LUCCI, C. M. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, p. 149-159, 2010.
- DAVIS, J. R. (Ed.). *Copper and copper alloys*. ASM International, 2001.
- DAVIS, G. K. & MERTZ, W. Copper. In: *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, 5th ed. (Ed.: W. Mertz). Academic Press, San Diego, pp. 301–364, 1987.
- DAWEI, A.; ZHISHENG, W.; ANGUO, Z. Protective effects of nano-ZnO on the primary culture mice intestinal epithelial cells in in vitro against oxidative injury. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 8, p. 1964–1967, 2009.
- DE CAMARGO, J. et al. Evaluation of a serum-free culture medium for the enhanced vitrification cryosurvival of bovine in vitro-derived embryos. *Livestock Science*, v. 260, p. 104922, 2022.
- DE LA TORRE-SANCHEZ, J. F. et al. Metabolic regulation of in vitro produced bovine embryos. II. Effects of phenazine ethosulfate, sodium azide and 2,4-dinitrophenol during postcompactation development on glucose metabolism and lipid accumulation. *Reproduction, Fertility and Development*, Melbourne, v. 18, n. 5, p. 597-607, 2006.
- DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C. The Importance of Having High Glutathione (GSH) Level after Bovine in vitro Maturation on Embryo Development: Effect of β -Mercaptoethanol, Cysteine and Cystine. *Theriogenology*, v. 53, p. 761–771, 2000.

DE SOUZA, D. K.; SALLES, L. P.; ROSA E SILVA, A. Aspects of energetic substrate metabolism of in vitro and in vivo bovine embryos. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 48, p. 191-197, 2015.

DEL COLLADO, M. et al. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behavior in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 10.1071/RD15067, 2015.

DEL COLLADO, M. et al. In vitro maturation impacts cumulus–oocyte complex metabolism and stress in cattle. *Reproduction*, v. 154, n. 6, p. 881-893, 2017.

DELUAO, J. C. et al. OXIDATIVE STRESS AND REPRODUCTIVE FUNCTION: Reactive oxygen species in the mammalian pre-implantation embryo. *Reproduction*, v. 164, n. 6, p. F95-F108, 2022.

DIAS, Luzia Renata Oliveira et al. Efeito de agentes delipidantes durante cultivo in vitro sobre o desenvolvimento, conteúdo lipídico, expressão gênica e criotolerância de embriões bovinos. *Reprodução em Animais Domésticos*, v. 55, n. 1, p. 11-20, 2020.

DOBRINSKY, J. R. Cryopreservation of swine embryos: A chilly past with a vitrifying future. *Theriogenology*, v. 56, p. 1333–1344, 2001.

DOWNS, S. M.; MOSEY, J. L.; KLINGER, J. F. Fatty acid oxidation and meiotic resumption in mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, v. 76, p. 844–853, 2009.

DUBEIBE MARIN, D. F. et al. Importance of lipid metabolism on oocyte maturation and early embryo development: can we apply what we know to buffalo? *Animal Reproduction Science*, v. 211, p. 106220, 2019.

DUCIBELLA, T. et al. Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca (2+) oscillation number. *Developmental Biology*, v. 250, p. 280–291, 2002.

DUMOLLARD, R.; DUCHEN, M.; CARROLL, J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Current Topics in Developmental Biology*, v. 77, p. 21–49, 2007.

DUMOLLARD, R. et al. Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 20, p. 346–353, 2009.

DUNNING, K. R. et al. β -oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biology of Reproduction*, v. 83, p. 909–918, 2010.

DUNNING, K. R. et al. Increased beta-oxidation and improved oocyte developmental competence in response to L-carnitine during ovarian in vitro follicle development in mice. *Biology of Reproduction*, v. 85, p. 548–555, 2011.

DUNNING, K. R., Russell, D. L., & Robker, R. L. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. *Reproduction*, v. 148, n. 1, p. R15-27, 2014.

DUNNING, K. R.; ROBKER, R. L. The role of L-carnitine during oocyte in vitro maturation: essential co-factor? Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE); Cabo de Santo Agostinho, PE, Brazil, August 17th to 19th, 2017.

EMILIANI, S., VAN DEN BERGH, M. J., & ENGLERT, Y. Alternative to transfer on day 2: What and when to transfer? In 1° Congrès national de la société italienne des embryologistes de médecine reproductive, p. 45, 2000.

ESTUDILLO, E., Jiménez, A., Bustamante-Nieves, P. E., Palacios-Reyes, C., Velasco, I., & López-Ornelas, A. Cryopreservation of gametes and embryos and their molecular changes. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 19, p. 10864, 2021.

FAHERTY, S. et al. Self-renewal and differentiation of mouse embryonic stem cells as measured by Oct4 expression: the role of the cAMP/PKA pathway. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, v. 43, p. 37–47, 2007.

FAHY, G. M. et al. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, v. 21, p. 407-426, 1984.

FAHY, E. et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, Bethesda, v. 50, p. 9-14, 2009.

FAHY, E., Cotter, D., Sud, M., Subramaniam, S. Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1811, n. 11, p. 637-647, 2011.

FAVIER, A. E. O papel do zinco na reprodução: mecanismos hormonais. *Pesquisa de Oligoelementos Biológicos*, v. 32, p. 363-382, 1992.

FERGUSON, E. M., Leese, H. J. A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Molecular Reproduction and Development*, v. 73, n. 9, p. 1195-1201, 2006.

FERRÉ, L. B. et al. Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, v. 14, n. 5, p. 991-1004, 2020.

- FERRÉ, L. B. et al. Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: Impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 55, n. 6, p. 659-676, 2020.
- FILHO, J. M. P. Improved in vitro production systems for bovine embryos. *CAB Reviews*, v. 10, n. 048, 2015.
- FRIBERG, J.; GEMZELL, C. Inseminations of Human Sperm after Freezing in Liquid Nitrogen Vapors with Glycerol or EggYolk–Citrate as Protective Media. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 116, p. 330–334, 1973.
- GALLEGO, F.; MANCHENO, A.; MENA, L.; MURILLO, A. Bovine in vitro Embryo Production: State of the Art. *ESPOCH Congresses: The Ecuadorian Journal of STEAM*, p. 172-185, 2022.
- GARDNER, D. K.; POOL, T. B.; LANE, M. Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation and viability. *Seminars in Reproductive Medicine*, San Francisco, v. 18, n. 2, p. 205-218, 2000.
- GARRETT, R. H.; GRISHAM, C. M. *Biochemistry*. Boston: Cengage Learning, 2012.
- SUD, M.; FAHY, E.; COTTER, D.; BROWN, A.; DENNIS, E.; GLASS, C.; MURPHY, R.; RAETZ, C.; RUSSELL, D.; SUBRAMANIAM, S. LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Res.*, v. 35, p. D527–D532, 2006.
- GÉHIN, C.; FOWLER, S. J.; TRIVEDI, D. K. Chewing the fat: How lipidomics is changing our understanding of human health and disease in 2022. *Analytical Science Advances*, 2023.
- GERELCHIMEG, B. et al. Effect of chilling on porcine germinal vesicle stage oocytes at the subcellular level. *Cryobiology*, v. 59, n. 1, p. 54–58, 2009.
- GHANEM, N.; FAKRUZZAMAN, M.; BATAWI, A. H.; KONG, I. K. Post-thaw viability, developmental and molecular deviations in in vitro produced bovine embryos cultured with l-carnitine at different levels of fetal calf serum. *Theriogenology*, v. 191, p. 54-66, 2022.
- GILBERT, S. F. *Developmental Biology*, 7th edn. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2003.
- FERREIRA, C. R.; CATHARINO, R. R.; SARAIVA, S. A.; FONSECA, M. F. R.; BASSO, A. C.; PONTES, J. H. F.; ERENO, J. C., Jr.; EBERLIN, M. N. Perspectivas para aplicação da técnica de espectrometria de massas na caracterização do lipidoma de oócitos e embriões bovinos produzidos in vitro. *Acta Clientage Veterinarian*, v. 36, n. 2, p. 549, 2008.

- GÓMEZ, E.; MUÑOZ, M.; RODRÍGUEZ, A.; CAAMAÑO, J. N.; FACAL, N.; DÍEZ, C. Vitrification of bovine blastocysts produced in vitro inflicts selective damage to the inner cell mass. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 44, n. 2, p. 194-199, 2009.
- GONZÁLEZ-SERRANO, A. F.; PIRRO, V.; FERREIRA, C. R.; OLIVERI, P.; EBERLIN, L. S.; HEINZMANN, J.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H.; COOKS, R. G. Desorption electrospray ionization mass spectrometry reveals lipid metabolism of individual oocytes and embryos. *PLoS One*, v. 8, n. 9, e 74981, 2013.
- GUALTIERI, R.; KALTHUR, G.; BARBATO, V.; DI NARDO, M.; ADIGA, S. K.; TALEVI, R. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress caused by cryopreservation in reproductive cells. *Antioxidants*, v. 10, n. 3, p. 337, 2021.
- GUERIF, F. et al. A simple approach for consumption and release (CORE) analysis of metabolic activity in single mammalian embryos. *PLoS One*, 2013.
- GUERIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human reproduction update*, v. 7, n. 2, p. 175-189, 2001.
- HAGUE, A.; ELDER, D. J.; HICKS, D. J.; PARASKEVA, C. Apoptosis in colorectal tumor cells: induction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate. *Int. J. Cancer.*, v. 60, p. 400–406, 1995.
- HAJIAN, M.; HOSSEINI, S. M.; OSTADHOSSEINI, S.; NASR-ESFAHANI, M. H. Comparative stepwise pattern of reactive oxygen species production during in vitro development of fertilized and nuclear transferred goat embryos. *International Journal of Fertility & Sterility*, v. 11, n. 2, p. 93, 2017.
- HAMBIDGE, K. M.; OLIVA-RASBACH, J.; JACOBS, M.; PURCELL, S.; STATLAND, C.; POIRIER, J. Randomized study of Zinc supplementation during pregnancy. *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, v. 45, CONF-8604222-, 1986.
- HAMDI, S. A.; NASSIF, O. I.; ARDAWI, M. S. M. Efeito da deficiência marginal ou grave de zinco na dieta no desenvolvimento testicular e nas funções do rato. *Arquivos de Andrologia*, v. 38, n. 3, p. 243-253, 1997.
- HAN, Y.; ISHIBASHI, S.; IGLESIAS-GONZALEZ, J.; CHEN, Y.; LOVE, N. R.; AMAYA, E. Ca²⁺-induced mitochondrial ROS regulate the early embryonic cell cycle. *Cell Reports*, v. 22, p. 218–231, 2018.
- HANSEN, P. Current and Future Assisted Reproductive Technologies for Mammalian Farm Animals. *Adv Exp Med Biol, Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 752, p. 1-22, 2014.

- HAQUE, M. Nano fabrics in the 21st century: a review. *Asian J Nanosci Mater.*, v. 2, n. 2, p. 131-48, 2019.
- HARA, K.; ABE, Y.; KUMADA, N.; AONO, N.; KOBAYASHI, J.; MATSUMOTO, H. Extrusion and Removal of Lipid from the Cytoplasm of Porcine Oocytes at the Germinal Vesicle Stage: Centrifugation under Hypertonic Conditions Influences Vitrification. *Cryobiology*, v. 50, p. 216–222, 2005.
- HARA, T.; KIMURA, I.; INOUE, D.; ICHIMURA, A.; HIRASAWA, A. Free fatty acid receptors and their role in regulation of energy metabolism. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, v. 164, p. 77–116, 2013.
- HARVEY, A. J. et al. REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction*, Cambridge, v. 123, n. 4, p. 479-486, 2002.
- HASHIMOTO, S. Application of in vitro maturation to assisted reproductive technology. *J. Reprod. Dev.*, n. 55, v. 1-10, 2009.
- HELD-HOELKER, E., KLEIN, S. L., RINGS, F., SALILEW-WONDIM, D., SAEED-ZIDANE, M., NEUHOFF, C., et al. Cryosurvival of in vitro produced bovine embryos supplemented with L-Carnitine and concurrent reduction of fatty acids. *Theriogenology*, v. 96, p. 145-152, 2017.
- HOELKER, M.; HELD, E.; SALILEW-WONDIM, D.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Molecular signatures of bovine embryo developmental competence. *Reprod Fertil Dev*, v. 26, p. 22-36, 2014.
- HONG, J. S., PARK, M. K., KIM, M. S., LIM, J. H., PARK, G. J., MAENG, E. H., et al. Estudo de toxicidade no desenvolvimento pré-natal de nanopartículas de óxido de zinco em ratos. *Jornal Internacional de Nanomedicina*, v. 9, n. sup2, p. 159-171, 2014.
- HONNOR, R. C., DHILLON, G. S., & LONDOS, C. cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. II. Definition of steady-state relationship with lipolytic and antilipolytic modulators. *J. Biol. Chem.*, v. 260, p. 15130-15138, 1985.
- HOSSEINI, S. M. et al. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important? *Journal of assisted reproduction and genetics*, v. 26, p. 355-364, 2009.
- HOYOS-MARULANDA, V. et al. Effects of polyunsaturated fatty acids on the development of pig oocytes in vitro following parthenogenetic activation and on the lipid content of oocytes and embryos. *Animal Reproduction Science*, 2019.
- HU, K.; YU, Y. Metabolite availability as a window to view the early embryo microenvironment in vivo. *Mol Reprod Dev*, v. 84, p. 1027-1038, 2017.

- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, v. 47, p. 23-32, 1997.
- IGONINA, T. N., BRUSENTSEV, E. Y., ROZHKOVA, I. N., NAPRIMEROV, V. A., AMSTISLAVSKY, S. Y. A comparison of different cryoprotectant solutions and thawing methods for the cryopreservation of embryos of mice and rats. *Russ J Genet Appl Res*, v. 6, p. 378–382, 2016.
- ISAAC, A. V. et al. Supplementing zinc oxide nanoparticles to cryopreservation medium minimizes the freeze-thaw-induced damage to spermatozoa. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 494, n. 3-4, p. 656-662, 2017.
- ISPADA, J. et al. Astaxanthin counteracts the effects of heat shock on the maturation of bovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 30, p. 1169-1179, 2018.
- JAYAPRAKASHA, G. K. et al. Antioxidant activity of grape seed (*vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food chemistry*, v. 73, n. 3, p. 285–290, 2001.
- JIN, B.; MAZUR, P. High survival of mouse oocytes/embryos after vitrification without permeating cryoprotectants followed by ultra-rapid warming with an IR laser pulse. *Scientific reports*, v. 5, n. 1, 9271, 2015.
- JOHNSON, L. A. Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome-bearing sperm based on DNA difference: a review. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 7, p. 893–903, 1995.
- KADER, A. A. et al. Factors affecting the outcome of human blastocyst vitrification. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 7, p. 1-11, 2009.
- KAMBE, T.; WEAVER, B. P.; ANDREWS, G. K. The genetics of essential metal homeostasis during development. *Genesis*, v. 46, p. 214–228, 2008.
- KAJI, M. Zinc in endocrinology. *Internat Pediatr*, v. 16, p. 1–7, 2001.
- KASAI, M.; MUKAIDA, T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod BioMed Online*, v. 9, p. 164-170, 2004.
- KAWANO, Y.; COHEN, D. E. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of gastroenterology*, v. 48, p. 434-441, 2013.
- KHALIQUE, M. A. et al. Antioxidant effects of zinc-oxide nanoparticles on post-thaw quality and in vivo fertility of Beetal buck spermatozoa. *Small Ruminant Research*, v. 225, 107012, 2023.
- KHAN, R. et al. Role of lipid metabolism and signaling in mammalian oocyte maturation, quality, and acquisition of competence. *Frontiers in cell and developmental biology*, v. 9, 639704, 2021.

- KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biol Reprod.*, v. 62, n. 4, p. 847-856, 2000.
- KIKUCHI, K. H. et al. Morphological features of lipid droplet transition during porcine oocyte fertilisation and early embryonic development to blastocyst in vivo and in vitro. *Zygote*, v. 10, n. 4, p. 355–366, 2002.
- KINGMA, S. E. et al. Permeability of the equine embryonic capsule to ethylene glycol and glycerol in vitro. *Theriogenology*, v. 76, p. 1540-1551, 2011.
- KNITLOVA, D. et al. Supplementation of l-carnitine during in vitro maturation improves embryo development from less competent bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 102, p. 16-22, 2017.
- KREBS, N. F.; HAMBIDGE, K. M. Necessidades de zinco e ingestão de zinco em bebês amamentados. *O jornal americano de nutrição clínica*, v. 43, n. 2, p. 288-292, 1986.
- KOTDAWALA, A. P. et al. A adição de zinco à ejaculação humana antes da criopreservação evita danos ao DNA induzidos pelo congelamento e descongelamento e preserva a função do esperma. *Jornal de reprodução assistida e genética*, v. 29, p. 1447-1453, 2012.
- KUES, W. A. et al. O perfil de expressão de todo o genoma revela grupos distintos de regulação transcricional durante o desenvolvimento pré-implantação bovino in vivo. *Anais da Academia Nacional de Ciências*, v. 105, n. 50, p. 19768-19773, 2008.
- KUMAR, S. et al. Antioxidant mediated protective effect of *Parthenium hysterophorus* against oxidative damage using in vitro models. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 13, n. 1, p. 120, 2013.
- KUMAR, R.; KUMAR, M.; LUTHRA, G. Fundamental approaches and applications of nanotechnology: A mini review. *Materials Today: Proceedings*, 2023.
- KUMARAN, R. S. et al. Cytotoxic effects of ZnO nanoparticles on the expression of ROS-responsive genes in the human cell lines. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 16, n. 1, p. 210-218, 2016.
- KUERSCHNER, L. et al. Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic*, v. 9, p. 338-352, 2009.
- KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biology of Reproduction*, v. 62, n. 4, p. 847-856, 2000.

KVIST, U. et al. Seminal fluid from men with agenesis of the Wolffian ducts: zinc-binding properties and effects on sperm chromatin stability. *International journal of andrology*, v. 13, n. 4, p. 245-252, 1990.

LAFONTAN, M.; BERLAN, M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J. Lip. Res.*, v. 34, p. 1057-1091, 1993.

LASSALLE, B.; TESTART, J.; RENARD, J. P. Características do embrião humano que influenciam o sucesso da criopreservação com uso de 1,2 propanodiol. *Fertilidade e esterilidade*, v. 44, n. 5, p. 645-651, 1985.

LAYDEN, B. T. et al. Short chain fatty acids and their receptors: new metabolic targets. *Translational Research*, v. 161, n. 3, p. 131-140, 2013.

LEE, C. H.; LIN, W. C.; WANG, J. All-optical measurements of the bending rigidity of lipid-vesicle membranes across structural phase transitions. *Phys Rev E*, 2001; 64:02090.

LEESE, H. J. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction*, v. 143, n. 4, p. 417-427, 2012.

LEESE, H. J. et al. Amino acids and the early mammalian embryo: Origin, fate, function and life-long legacy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 18, n. 18, p. 9874, 2021.

LIEBERMANN, J. et al. Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the Flexipet denuding pipette. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 4, n. 2, p. 146-150, 2002.

LIN, D.; XING, B. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental pollution*, v. 150, n. 2, p. 243-250, 2007.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 37, n. 3, 2001.

LIMA, I. M. T.; SOUZA, A. L. Desenvolvimento e sobrevivência de embriões no período de préimplantação: enfoque em ruminantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 33, n. 4, p. 194-202, 2009.

LIU, T. et al. Lipid metabolic process involved in oocyte maturation during folliculogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 10, p. 806890, 2022.

- LONERGAN, P. et al. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J Reprod Fertil*, v. 117, p.159-167, 1999.
- LONERGAN, P. et al. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, 65:137–52, 2006.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M. P. Oocyte and embryo quality: Effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Domest Anim*, v. 38, p. 259-267, 2003.
- LONERGAN, P. et al. The role of progesterone in embryo development in cattle. *Reprod. Fertil Dev*, v. 28, p. 66-74, 2016.
- LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol*, v. 5, n. 1, p. 5-17, 2005.
- LUNDQVIST, M.; JOHANSSON, U.; LUNDKVIST, O.; MILTON, K.; WESTIN, C.; SIMBERG, N. Does pronuclear morphology and/or early cleavage rate predict embryo implantation potential? *Reprod Biomed Online*, v. 2, p. 12-16, 2001.
- LUZ, H. K. M. et al. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 39, p. 956, 2011.
- MANJUNATHA, B. M. et al. Effect of vitrification medium composition and exposure time on post-thaw development of buffalo embryos produced in vitro. *The Veterinarian Journal*, v. 179, p. 287-291, 2009.
- MARINHO, L. S. R. Conjugated linoleic acid in cryotolerance of bovine in vitro - produced embryos. 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.
- MARSICO, T. V. et al. Embryo competence and cryosurvival: Molecular and cellular features. *Animal Reproduction*, v. 16, p. 423-439, 2019.
- MARSICO, T. V. et al. Unraveling the Consequences of Oxygen Imbalance on Early Embryo Development: Exploring Mitigation Strategies. *Animals*, v. 13, n. 13, p. 2171, 2023.
- MARTIN, C. A. et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*, v. 19, p. 761-770, 2006.
- MAY-PANLOUP, P. et al. Embryo and its mitochondria. *Antioxidants*, v. 10, n. 2, p. 139, 2021.

- MCEVOY, T. G. et al. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pelúcida. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 118, n. 1, p. 163–170, 2000.
- MCGARRY, J. D.; MANNAERTS, G. P.; FOSTER, D. W. A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J. Clin. Invest.*, v. 60, p. 265–270, 1977.
- MCKEEGAN, P. J.; STURMEY, R. G. The role of fatty acids in oocyte and early embryo development. *Reprod Fertil Dev*, v. 24, p. 59-67, 2011.
- MEN, H. et al. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. *Theriogenology*, v. 66, p. 2008–16, 2006.
- MENEGHEL, M. et al. Lipid content and cryotolerance of in vitro-produced bovine embryos treated with forskolin before vitrification. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 37, 395-400, 2017.
- MERTON, S. Morphological Evaluation of Embryos in Domestic Species. In: Van Soom A, Boerjan M. (Ed.) *Assessment of Mammalian Embryo Quality*. Springer Science+Business Media Dordrecht, 2002, pp. 429.
- MILLER, R. J. et al. Impacts of metal oxide nanoparticles on marine phytoplankton. *Environ Sci Technol*, v. 4, n. 19, p. 7329–7334, 2010.
- MISHRA, A., REDDY, I., GUPTA, P., MONDAL, S. L-carnitine mediated reduction in oxidative stress and alteration in transcript level of antioxidant enzymes in sheep embryos produced in vitro. *Reprod Domest Anim*, 2016; 51: 311.
- MONTANI, D. A. et al. Understanding mechanisms of oocyte development by follicular fluid lipidomics. *J. Assist. Reprod. Genet.*, v. 36, p. 1003–1011, 2019.
- MONTJEAN, D. et al. Carnitine content in the follicular fluid and expression of the enzymes involved in beta oxidation in oocytes and cumulus cells. *J Assist Reprod Genet*, v. 29, p. 1221-1225, 2012.
- MORADO, S. A.; CETICA, P. D.; BECONI, M. T.; DALVIT, G. C. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 21, p. 608–614, 2009.
- MOROTTI, F. et al. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus taurus* and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology*, v. 81, p. 696-701, 2014.

- MUCCI, N. et al. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, v. 65, p. 1551–1562, 2006.
- MUELLER, M. L.; VAN EENENNAAM, A. L. Synergistic power of genomic selection, assisted reproductive technologies, and gene editing to drive genetic improvement of cattle. *CABI Agriculture and Bioscience*, v. 3, n. 1, p. 13, 2022.
- NAGASHIMA, H. et al. Removal of Cytoplasmic Lipid Enhances the Tolerance of Porcine Embryos to Chilling. *Biol Reprod*, v. 51, n. 4, p. 618-622, 1994.
- NAGY, K.; TIUCA, I. D. Importance of fatty acids in physiopathology of human body. In *Fatty acids*. IntechOpen.
- NAKAMURA, M. T.; YUDELL, B. E.; LOOR, J. J. Regulation of the energy metabolism by long-chain fatty acid. *Progress in Lipid Research*, v. 53, p. 124–144, 2014.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1304 p.
- NOSE, F. et al. Crucial role of perilipin-3 (TIP47) in formation of lipid droplets and PGE2 production in HL-60-derived neutrophils. *PLoS One*, v. 8, n. 8, e71542, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0071542.
- O'DONNELL, V. B. et al. Lipidomics: current state of the art in a fast moving field. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, v. 12, e1466, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/wsbm.1466>.
- OKOTRUB, K. A. et al. Raman spectroscopy reveals the lipid phase transition in preimplantation mouse embryos during freezing. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 635, p. 37–43, 2017.
- OLIVEIRA, C. S. et al. In-straw warming protocol improves survival of vitrified embryos and allows direct transfer in cattle. *Cryobiology*, v. 97, p. 222-225, 2020.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD); FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). 29pp, 2018.
- OSEIKRIA, M. N-3 polyunsaturated fatty acid DHA during IVM affected oocyte developmental competence in cattle. *Theriogenology*, v. 85, n. 9, p. 1625-1634.e2, 2016.
- OZIL, J. P.; BANREZES, B.; TOTH, S.; PAN, H.; SCHULTZ, R. M. Ca²⁺ oscillatory pattern in fertilized mouse eggs affects gene expression and development to term. *Developmental Biology*, v. 300, p. 534–544, 2006.

- PACZKOWSKI, M. et al. Comparative importance of fatty acid β -oxidation to nuclear maturation, gene expression, and glucose metabolism in mouse, bovine, and porcine cumulus–oocyte complexes. *Biology of Reproduction*, v. 88, n. 111, 2013.
- PALASZ, A. T.; MAPLETOFT, R. J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances*, v. 14, p. 127-149, 1996.
- PALMA, G. A. Producción in vitro de embriones bovinos. In: PALMA, G. A. *Biotecnología de La reproducción*. 2. ed. Mar del Plata - Argentina, p. 313-380, 2008.
- PANDEY, A. K. et al. Antifungal and antioxidative potential of oil and extracts derived from leaves of indian spice plant *Cinnamomum tamala*. *Cellular and Molecular Biology*, v. 58, n. 1, p. 142–147, 2012.
- PAULL, R.; WOLFE, J.; HÉBERT, P.; SINKULA, M. Investindo em nanotecnologia. *Biotecnologia da Natureza*, v. 21, n. 10, p. 1144-1147, 2003.
- PARRISH, J. J. et al. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, v. 25, p. 591–60, 1986.
- PASCHOAL, D. M. et al. Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. *Zygote*, v. 22, n. 2, p. 146-157, 2014.
- PASCHOAL, D. M. et al. Decreased lipid granules of in vitro produced bovine embryos with low concentrations of forskolin. *Animal Reproduction*, v. 12, p. 686, 2015.
- PASCHOAL, D. M. et al. Cell apoptosis and lipid content of in vitro–produced, vitrified bovine embryos treated with forskolin. *Theriogenology*, v. 87, p. 108-114, 2017.
- PATRÓN-ROMERO, L. et al. Mitochondrial Dysfunction Induced by Zinc Oxide Nanoparticles. *Crystals*, v. 12, n. 8, p. 1089, 2022.
- PEREIRA, R. M.; MARQUES, C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell and Tissue Banking*, v. 9, n. 4, p. 267–277, 2008.
- PEROBELLI, F. S.; ARAÚJO JUNIOR, I. F. D.; CASTRO, L. S. D. As dimensões espaciais da cadeia produtiva do leite em Minas Gerais. *Nova Economia*, v. 28, p. 297-337, 2018.
- PICCO, S. J. et al. Effect of increasing zinc sulphate concentration during in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 74, n. 7, p. 1141-1148, 2010.
- PINA, K. V. et al. Nanotecnologia e nanobiotecnologia: estado da arte, perspectivas de inovação e investimentos. *Revista Gestão Industrial*, v. 2, n. 2, 2006.
- POLGE, C. The freezing of mammalian embryos: Perspectives and possibilities. *Ciba Found Symp*, v. 52, p. 3-1, 1977.

- POPE, C. E. Aspects of in vivo oocyte production, blastocyst development, and embryo transfer in the cat. *Theriogenology*, v. 81, p. 126–137, 2014.
- PRASAD, A. S. et al. Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 61, n. 4, p. 537-549, 1963.
- PRATES, E. G. et al. Fat area and lipid droplets morphology of porcine oocytes during in vitro maturation with trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid (t10,c12 CLA) and forskolin. *Animal*, v. 7, n. 4, p.602–609, 2012.
- PRATES, E. G. A Role of Lipid Metabolism during Cumulus-Oocyte Complex Maturation: Impact of Lipid Modulators to Improve Embryo Production. *Mediators of Inflammation*, 11p., 2014.
- QUINN, P. J. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology*, v. 22, n. 2, p. 128-146, 1985.
- QUINTÃO, C. C. R. et al. Challenges in the use of nanostructures as carriers of nucleic acids in clinical practice. *einstein (São Paulo)*, v. 20, 2022.
- RALL, W. F.; FAHY, G. M. Criopreservação sem gelo de embriões de camundongos a -196°C por vitrificação. *Natureza*, v. 313, n. 6003, p. 573-575, 1985.
- RAMOS-IBEAS, P. et al. Embryo responses to stress induced by assisted reproductive technologies. *Molecular reproduction and development*, v. 86, n. 10, p. 1292-1306, 2019.
- RASMUSSEN, J. W. et al. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opin. Drug Deliv.*, v. 7, p. 1063–1077, 2010.
- RASMUSSEN, K. et al. Physico-chemical properties of manufactured nanomaterials - characterisation and relevant methods. An outlook based on the OECD Testing Programme. *Regul Toxicol Pharmacol*, v. 92, p. 8-28, 2018.
- RAZA, S. H. A. et al. The role of forskolin as a lipolytic stimulator during in vitro oocyte maturation and the in vitro embryo production of livestock. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 56, n. 12, p. 1486-1496, 2021.
- RIENZI, L. et al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Human Reproduction Update*, v. 23, n. 2, p. 139-155, 2017. DOI: 10.1093/humupd/dmw038.

- RIHA, A. J.; MACHATKOVA, M.; PAVLOK, A. Viabilidade de embriões bovinos IVP transferidos frescos e congelados. *Tcheco Journal of Animal Science*, v. 47, p. 261, 2002.
- RIFFO, M.; LEIVA, S.; ASTUDILLO, J. Efeito do zinco na motilidade do esperma humano e na reação acrossômica. *Revista Internacional de Andrologia*, v. 15, n. 3, p. 229-237, 1992.
- RIZOS, D. et al. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction*, v. 68, p. 236-243, 2003.
- ROMÃO, R. et al. Cryopreservation of in vitro-produced sheep embryos: Effects of different protocols of lipid reduction. *Theriogenology*, v. 84, n. 1, p. 118-126, 2015.
- ROMEK, M. et al. Mitochondrial activity and morphology in developing porcine oocytes and pre-implantation non-cultured and cultured embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 46, n. 3, p. 471-480, 2011.
- SÁNCHEZ, F. et al. In vitro follicle growth under non-attachment conditions and decreased FSH levels reduces Lhcgr expression in cumulus cells and promotes oocyte developmental competence. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 29, p. 141-152, 2012.
- SANCHES, B. V. et al. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology*, v. 80, p. 372-377, 2013.
- SANCHES, B. V. et al. Cryopreservation of in vitro-produced embryos: challenges for commercial implementation. *Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)*, Cabo de Santo Agostinho, PE, Brazil, August 17th to 19th, 2017.
- SANCHES, B. V. et al. Intensive use of IVF by large-scale dairy programs. *Proceedings of the 33rd Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)*, Ilha de Comandatuba, BA, Brazil, August 15th to 19th, 2019.
- SANCHEZ-LAZO, L. et al. Fatty acid synthesis and oxidation in cumulus cells support oocyte maturation in bovine. *Molecular Endocrinology*, v. 28, n. 9, p. 1502-1521, 2014.
- SANJAY, S. S. et al. Cell membrane protective efficacy of ZnO nanoparticles. *SOP Transactions on Nano Technology*, v. 1, n. 1, 2014.
- SASTRE, D. et al. Expression of PLIN2 and PLIN3 during oocyte maturation and early embryo development in cattle. *Theriogenology*, v. 81, n. 2, p. 326-331, 2014.

- SCHELL, T. C. e KORNEGAY, E. T. Concentração de zinco nos tecidos e desempenho de leitões desmamados alimentados com níveis farmacológicos de zinco de ZnO, Zn-metionina, Zn-lisina ou ZnSO₄. *Journal of Animal Science*, v. 74, n. 7, p. 1584-1593, 1996.
- SEAMON, K. e DALY, J. W. Activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin does not require the guanine nucleotide regulatory protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 256, p. 9799–801, 1981.
- SEIDEL Jr., G. E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*, v. 65, n. 1, p. 228–235, 2006.
- SHADEL, G. S. e HORVATH, T. L. Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis. *Cell*, v. 163, p. 560–569, 2015.
- SHANKAR, A. H. e PRASAD, A. S. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 68, n. 2 Suppl, p. 447S-463S, 1998.
- SHAW, L. et al. Comparison of gene expression in fresh and frozen-thawed human preimplantation embryos. *Reproduction*, v. 144, p. 569-582, 2012.
- SHERMAN, J. K. Synopsis of the Use of Frozen Human Semen Since 1964: State of the Art of Human Semen Banking. *Fertility and Sterility*, v. 24, p. 397–412, 1973.
- SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 27, p. 916–921, 1999.
- SINHA, R. et al. Interaction and nanotoxic effect of ZnO and Ag nanoparticles on mesophilic and halophilic bacterial cells. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 2, p. 1516–1520, 2011.
- SIRARD, M. 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. *Reproduction*, v. 156, p. R1-R7, 2018.
- SMITH, A. D. *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press, 2000.
- SOMFAI, T. et al. Enhancement of lipid metabolism with L-carnitine during in vitro maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 23, n. 7, p. 912-920, 2011.
- SOUZA, D. K. et al. Aspects of energetic substrate metabolism of in vitro and in vivo bovine embryos. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 48, n. 3, p. 191-197, 2015.

- SOVERNIGO, T. C. et al. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 52, n. 4, p. 561-569, 2017.
- STOKES, P. J. et al. Metabolism of human embryos following cryopreservation: implications for the safety and selection of embryos for transfer in clinical IVF. *Human Reproduction*, v. 22, p. 829-835, 2007.
- STONE, S. J. et al. The endoplasmic reticulum enzyme DGAT2 is found in mitochondria-associated membranes and has a mitochondrial targeting signal that promotes its association with mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 8, p. 5352-5361, 2009.
- STURMEY, R. G. et al. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial:lipid association in the porcine oocyte. *Reproduction*, v. 132, p. 829–837, 2006.
- STURMEY, R. G. et al. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 44, n. 3, p. 50–58, 2009.
- STROEBECH, L. et al. In vitro production of bovine embryos: revisiting oocyte development and application of systems biology. *Animal Reproduction*, v. 12, n. 3, p. 465-472, 2015.
- SUD, M. et al. LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Research*, v. 35, 2006.
- SUDANO MJ. et al. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*, v. 75, p. 1211-1220, 2011.
- SUDANO, M.J. et al. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. *Biology of Reproduction*, v. 87, n. 6, 2012.
- SUDANO, M.J. et al. Improving postcryopreservation survival capacity: an embryo-focused approach. *Animal Reproduction*, v. 10, p. 160-167, 2013.
- SUDANO, M.J. et al. Lipidome signatures in early bovine embryo development. *Theriogenology*, v. 86, p. 472-484, 2016.
- SUTTON-MCDOWALL, M. L. et al. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*, v. 77, n. 8, p. 1632-1641, 2012.

- TAKAHASHI, T. et al. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 25, n. 4, p. 589-599, 2013.
- TALEVI, R. et al. Redox regulation of sperm surface thiols modulates adhesion to the fallopian tube epithelium. *Biology of Reproduction*, v. 76, p. 728-735, 2007.
- TALLEY, J. T.; MOHIUDDIN, S. S. *Biochemistry, fatty acid oxidation*.
- TARAZONA, A. M. et al. 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.
- TATONE, C. et al. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. *Gynecological Endocrinology*, v. 26, p. 563-567, 2010.
- TATONE, C.; DI EMIDIO, G. Mitochondria biology in reproductive function. *Antioxidants*, v. 11, n. 10, p. 1978, 2022.
- TESFAYE, D. et al. Identificação e perfil de expressão de microRNAs durante a maturação de oócitos bovinos utilizando abordagem heteróloga. *Reprodução e Desenvolvimento Molecular*, v. 76, n. 7, p. 665-677, 2009.
- THOMPSON, J.G. et al. Partitioning of glucose carbon in post-compaction ovine embryos. *Animal Reproduction Science*, v. 38, p. 119-126, 1995.
- THOMPSON, J.G. et al. Metabolism of the bovine cumulus oocyte complex and influence on subsequent developmental competence. *Society of Reproduction and Fertility. Supplement*, v. 64, p. 179-190, 2007.
- TORRES-OSORIO, V. et al. Oxidative stress and antioxidant use during in vitro mammal embryo production. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, v. 10, n. 2, p. 433-459, 2019.
- TSUJII, H. et al. Lipid in mammalian embryo development. *Journal of Mammalian Ova Research*, v. 18, n. 3, p. 73-80, 2001.
- VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, v. 65, p. 236-244, 2006.
- VALENTE, R. S.; MARSICO, T. V.; SUDANO, M. J. Basic and applied features in the cryopreservation progress of bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, v. 239, p. 106970, 2022.
- VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P. W.; LEE, J. Fertilization and early embryology: ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Human Reproduction*, v. 10, n. 2, p. 415-424, 1995.

VAN BLERKOM, J. Mitochondria in early mammalian development. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 20, p. 354-364, 2009.

VAN BLERKOM, J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion*, v. 11, n. 5, p. 797-813, 2011.

VAN HOECK, V. et al. Interaction between differential gene expression profile and phenotype in bovine blastocysts originating from oocytes exposed to elevated non-esterified fatty acid concentrations. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 27, n. 2, p. 372-384, 2015.

VAN SOOM, A.; MATEUSEN, B.; LEROY, J.; DE KRUIF, A. Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? *Reproductive Biomedicine Online*, v. 7, p. 664-670, 2003.

VANCE, D. E.; VANCE, J. E. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. 5th ed. New York: Elsevier Science, 624 p., 2008.

VARAGO, F. C. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 32, p. 100-109, 2008.

VARGHESE, A. C. et al. Current trends, biological foundations and future prospects of oocyte and embryo cryopreservation. *Reproductive Biomedicine Online*, v. 19, p. 126-140, 2009.

VENTURA-JUNCA, P. et al. In vitro fertilization (IVF) in mammals: epigenetic and developmental alterations. Scientific and bioethical implications for IVF in humans. *Biological Research*, v. 48, n. 1, p. 1-13, 2015.

VIANA, J. H. M. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. In: *Embryo Technology Newsletter*. 2019;36(4): 8-25. Disponível em: http://www.iets.org/comm_data.asp.

VIANA, J. H. M. A new milestone has been reached: Transfers of IVP embryos were over one million worldwide. 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 2022.

WAGH, V. D. et al. Forskolin: Upcoming antiglaucoma molecule. *Journal of Postgraduate Medicine*, v. 58, p. 199-202, 2012.

WAKIL, S. J. The fatty acid synthase: a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry*, v. 28, p. 4523-4530, 1989.

WAKIL, S. J.; ABU-ELHEIGA, L. A. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *Journal of Lipid Research*, v. 50, p. S138-S143, 2009.

- WANG, X. et al. Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress induced embryo toxicity and improve the blastocyst. *Fertility and Sterility*, v. 78, n. 6, p. 1272-1277, 2002.
- WARD, F. et al. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration, and sire. *Theriogenology*, v. 57, p. 2105–2117, 2002.
- WARZYCH, E. et al. Interactions of bovine oocytes with follicular elements with respect to lipid metabolism. *Animal Science Journal*, v. 88, n. 10, p. 1491-1497, 2017.
- WAUBEN, I. P.; XING, H. C.; WAINWRIGHT, P. E. A deficiência de zinco na dieta neonatal em filhotes de ratos criados artificialmente retarda o desenvolvimento comportamental e interage com a deficiência de ácidos graxos essenciais para alterar a composição de ácidos graxos do fígado e do cérebro. *The Journal of Nutrition*, v. 129, n. 10, p. 1773-1781, 1999.
- WELTE, M. A.; GOULD, A. P. Lipid droplet functions beyond energy storage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1862, n. 10, p. 1260-1272, 2017.
- WHITTINGHAM, D. G. Survival of Mouse Embryos after Freezing and Thawing. *Nature*, v. 233, p. 125–126, 1971.
- WIGGANS, G. R. et al. Genomic Selection in Dairy Cattle: The USDA Experience. *Annual Review of Animal Biosciences*, v. 5, n. 13, p. 1-13, 2017.
- WILMUT, I.; ROWSON, L. E. A. Experiments on the Low Temperature Preservation of Cow Embryos. *Veterinary Record*, 1973.
- WU, L. L. Y.; NORMAN, R. J.; ROBKER, R. L. The impact of obesity on oocytes: evidence for lipotoxicity mechanisms. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 24, n. 1, p. 29-34, 2011.
- YANG, X. et al. Identification of Perilipin-2 as a lipid droplet protein regulated in oocytes during maturation. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 22, p. 1262-1271, 2010.
- YE, J. et al. L-carnitine attenuates oxidant injury in HK-2 cells via ROS-mitochondria pathway. *Regulatory Peptides*, v. 161, p. 58–66, 2010. doi: 10.1016/j.regpep.2009.12.024.
- YETUKURI, L.; EKROOS, K.; VIDAL-PUIG, A.; ORESIC, M. Informatics and computational strategies for the study of lipids. *Molecular BioSystems*, v. 4, p. 121–127, 2008.

- ZANDER-FOX, D. et al. The presence of 1 mM glycine in vitrification solutions protects oocyte mitochondrial homeostasis and improves blastocyst development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 30, p. 107-116, 2013.
- ZEILMAKER, G. H. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertility and Sterility*, v. 42, p. 293–296, 1984.
- ZENG, X. et al. Role of functional fatty acids in modulation of reproductive potential in livestock. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 14, n. 1, p. 24, 2023.
- ZERON, Y. et al. Seasonal changes in bovine fertility: Relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction*, v. 121, p. 447–454, 2001.
- ZERON, Y. et al. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, v. 61, p. 271–278, 2002.
- ZHANG, L. et al. Investigation into the antibacterial behavior of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). *Journal of Nanoparticle Research*, v. 9, p. 479-489, 2007.
- ZHANG, Y. et al. Aplicações biomédicas de nanomateriais de óxido de zinco. *Medicina Molecular Atual*, v. 13, n. 10, p. 1633-1645, 2013.
- ZOLINI, A. M. et al. Effect of addition of L-carnitine to media for oocyte maturation and embryo culture on development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*, v. 133, p. 135-143, 2019.
- ZÜLLIG, T.; KÖFELER, H. C. High resolution mass spectrometry in lipidomics. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 40, p. 162-176, 2021.

2 CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO E QUALIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS APÓS O USO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE L-CARNITINA, FORSCOLINA, E NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO NA MATURAÇÃO *IN VITRO*

2.1 INTRODUÇÃO

No último século, a agropecuária experimentou avanços significativos devido à introdução de inovadoras biotecnologias reprodutivas, como a criopreservação de gametas e embriões, a inseminação artificial e a transferência de embriões. Posteriormente, a ultrassonografia, que possibilitou a coleta transvaginal de oócitos, e a técnica de fertilização *in vitro*, revolucionaram a produção de embriões, encurtando os intervalos geracionais e possibilitando ganhos genéticos importantes aos produtores (Blondin, 2018; Mueller; Van Eenennaam, 2022). Essas tecnologias têm sido fundamentais para impulsionar a indústria agrícola e melhorar a eficiência na criação de animais.

Globalmente, tem sido evidente um aumento contínuo no número de embriões produzidos *in vitro* ao longo do tempo, com um destaque particular para a América do Norte e América do Sul. Em todo o mundo, mais de um milhão de embriões bovinos produzidos *in vitro* foram gerados em 2018. Destes, 742.908 foram transferidos e mais de 50% das transferências ocorreram na América do Sul. No Brasil, mais de 270.000 embriões produzidos por PIV foram transferidos em 2018 (Mueller; Van Eenennaam, 2022).

Segundo Baruselli *et al.* (2019), a ampla adoção de biotecnologias reprodutivas no Brasil, aumenta a produtividade por unidade de terra e contribui, significativamente, tanto para melhorar a eficiência da pecuária, como para reduzir o impacto ambiental. No entanto, a contínua disseminação dessas tecnologias, depende, entre outros fatores, do desenvolvimento de produtos e protocolos mais eficientes que permitam assegurar a qualidade dos embriões produzidos *in vitro*, já que essa característica está diretamente relacionada ao sucesso da gestação, após a transferência desses embriões para as receptoras (Zullo *et al.*, 2016). Contudo, sabe-se que a composição dos meios de cultivo e o próprio ambiente *in vitro* exercem forte influência sobre a

viabilidade e metabolismo embrionários (Hosseini *et al.*, 2009) e constituem alguns dos fatores relacionados às diferenças observadas entre embriões produzidos *in vitro* e *in vivo*.

Apesar da importância dos lipídios como componentes essenciais (Lopez-Damián *et al.*, 2018), com diferentes funções e estruturas, sobretudo a homeostase energética celular (Amstislavsky *et al.*, 2019), o excesso de gotículas lipídicas embrionárias é considerado como uma das razões para a baixa criotolerância (Abe *et al.*, 2002; Rizos *et al.*, 2003; Sudano *et al.*, 2011) de embriões PIV, que, além do acúmulo também apresentam um perfil lipídico distinto dos embriões produzidos *in vivo* (de Camargo *et al.*, 2022).

De tal modo, numerosas pesquisas têm sido direcionadas à minimização do acúmulo (Baldoceca *et al.*, 2016; Amstislavsky *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2019) e à otimização do perfil lipídico (Sudano *et al.*, 2012; Vireque *et al.*, 2016; Pitangui-Molina *et al.*, 2017; de Camargo *et al.*, 2022), como tentativas de melhorar as taxas de criosobrevivência de embriões PIV. Embora a razão para o aumento da quantidade de gotículas lipídicas ainda não seja completamente compreendida, sabe-se que as próprias condições, inerentes ao cultivo *in vitro* (Sata, *et al.*, 1999) podem contribuir para o aumento de triglicerídeos e ácidos graxos livres embrionários. Em decorrência, podem ocorrer danos nas funções mitocondriais e no retículo endoplasmático, que, conseqüentemente, afetam a capacidade de desenvolvimento embrionário (Wu, *et al.*, 2011).

Uma alternativa para tentar reduzir o conteúdo lipídico embrionário, é a utilização de reguladores metabólicos, como a L- carnitina e a forskolina, que podem ser adicionados em diferentes etapas da PIVE (Carrillo-González *et al.*, 2020) com o intuito de melhorar a competência de desenvolvimento e a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* (Knitlova *et al.*, 2017).

A forskolina tem atividade lipolítica (Paschoal *et al.*, 2017) e seu mecanismo de ação ocorre através da ativação da enzima adenilato ciclase e do aumento do AMPc. O AMPc, por sua vez, estimula a produção de proteína quinase, que ativa lipases endógenas, resultando em degradação de lipídios e liberação de ácidos graxos e glicerol (Cuello *et al.*, 2013). Efeitos da forskolina no desenvolvimento embrionário (Cuello *et al.*, 2013), acúmulo lipídico (Barceló-Fimbres, *et al.*, 2007) e criotolerância (Paschoal *et al.*, 2014) tem sido descritos na literatura. Entretanto, não há um consenso em relação à concentração ótima desse regulador metabólico ou uma

avaliação mais ampla dos seus efeitos sob diferentes aspectos do desenvolvimento embrionário.

A L-carnitina tem sido descrita como um cofator que facilita a mobilização dos ácidos graxos presentes no citoplasma do oócito para o interior das mitocôndrias, facilitando os processos de β -oxidação (Carrillo-González *et al.*, 2023). Efeitos positivos da suplementação de L-carnitina no meio de maturação ou no meio de cultivo têm sido demonstrados em diversos estudos (Sutton-McDowall, *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2013; Mishra *et al.*, 2016; Knitlova *et al.*, 2017). No entanto, apesar da extensão dos relatos sobre os efeitos da adição da L-carnitina na MIV ou CIV, percebe-se resultados contraditórios (Carrillo-González *et al.*, 2019; Carrillo-González *et al.*, 2023) e ausência de padronização das condições de cultivo para efeito de comparação das estratégias.

A nanotecnologia tem se consolidado como importante área da ciência (Boholm, M.; Boholm, A., 2012), principalmente, devido ao fato das nanopartículas exibirem propriedades físicas diferentes das partículas não nanoestruturadas, como por exemplo, uma maior área superficial, o que intensifica sua capacidade de interação celular e o seu potencial biológico (Albanese *et al.*, 2012). Como o zinco já atua como cofator de importantes enzimas durante o desenvolvimento embrionário (Picco *et al.*, 2010), NPZNOs têm sido utilizadas como estratégias mais promissoras que o zinco, na sua forma isolada, na otimização do desenvolvimento *in vitro* de embriões de búfalos (Kandil *et al.*, 2023) e bovinos (Abdel-Halim; Helmy, 2017), e na redução dos efeitos da peroxidação lipídica durante a criopreservação (Isaac *et al.*, 2017).

Nesse contexto, como primeira parte desse estudo, esse capítulo visa relatar os efeitos de diferentes concentrações da L-carnitina (2,5 e 5mM), forskolina (10 e 15 μ M) e NPZNOs (1,0 e 1,5 μ g/mL) no desenvolvimento e acúmulo lipídico em embriões bovinos produzidos *in vitro*. A partir dos resultados obtidos, foi definida uma concentração de cada substância para os estudos apresentados no capítulo 2. O objetivo final desse trabalho foi delinear a melhor estratégia de suplementação na MIV, com foco em redução do conteúdo lipídico e do estresse oxidativo, visando obter melhorias nas taxas de desenvolvimento pré implantacional e de criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de estratégias durante a MIV para regulação metabólica, com o uso de L-carnitina e forskolina, e para mitigação de lipoperoxidação, com adição de NPZNOs, sobre o desenvolvimento, acúmulo lipídico e qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

2.2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar as NPZNOs em relação ao tamanho, morfologia e carga superficial;
- Avaliar os impactos da adição isolada de duas concentrações de L-carnitina, 2,5 mM e 5mM, durante a MIV, analisando as taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário no sétimo dia (D7), acúmulo lipídico e número total de células, como parâmetro para inferência de qualidade embrionária;
- Investigar os efeitos da adição isolada de duas concentrações de forskolina, 10 μ M e 15 μ M, durante a MIV, abrangendo as taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário no sétimo dia (D7), acúmulo lipídico e número total de células, como parâmetro para inferência de qualidade embrionária;
- Analisar os impactos da adição isolada de duas concentrações de NPZNOs, 1,0 μ g/mL e 1,5 μ g/mL, durante a MIV, considerando as taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário no sétimo dia (D7), acúmulo lipídico e número total de células, como parâmetro para inferência de qualidade embrionária.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Local dos experimentos

As nanopartículas foram sintetizadas no Laboratório de Nanotecnologia para o Agronegócio da Embrapa Instrumentação (São Carlos, SP), onde também foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise do tamanho e potencial zeta das nanopartículas foi realizada pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering-DLS*), no Laboratório de Inovação e Nanobiotecnologia de Materiais Avançados para Pecuária da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

Os experimentos envolvendo a PIVE, colorações e criopreservação, foram conduzidos no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG)

2.3.2 Meios de cultivo e reagentes

Os produtos químicos foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), e os meios de maturação, fertilização e cultivo embrionários foram adquiridos da empresa Bioklone® Reprodução Animal (Jaboticabal, São Paulo, Brasil), exceto quando especificados de outra forma.

2.3.3 Delineamento experimental

Inicialmente, foram realizadas análises para a caracterização das NPZNOs. Em seguida, adá regulador metabólico (L-carnitina e forskolina) e as NPZNOs foram adicionados ao meio de maturação, em duas concentrações, resultando em sete grupos experimentais: 1) Controle (sem adição de reguladores metabólicos e NPZNOs);

2) Meio MIV com NPZNOs 1,0 μ g/mL; 3) Meio MIV com NPZNOs 1,5 μ g/mL; 4) Meio MIV com L-carnitina 2,5mM; 5) Meio MIV com L-carnitina 5,0mM; 6) Meio MIV com forskolina 10 μ M; 7) Meio MIV com forskolina 15 μ M. Após a maturação, os oócitos foram fertilizados e cultivados *in vitro* até o D7. No D7, os blastocistos foram avaliados em relação ao desenvolvimento embrionário (taxas de clivagem e de blastocistos) e, em seguida, fixados para avaliação do acúmulo lipídico e número de células totais (figura 12).

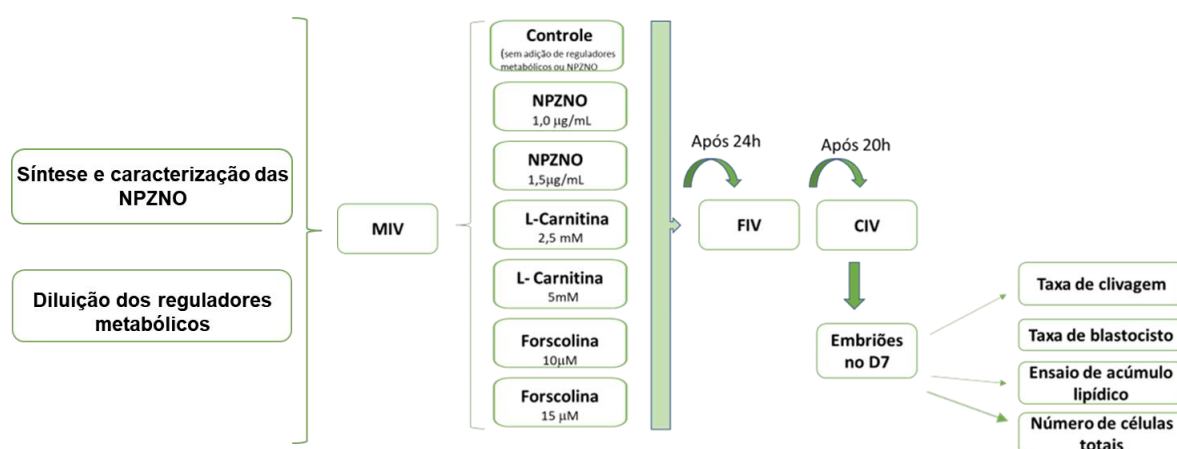


Figura 12: Representação esquemática do delineamento do experimento do capítulo 1.

2.3.4 Síntese das nanopartículas de óxido de zinco (NPZNOs)

Foi utilizado o método *Top-down*. A técnica para reduzir mecanicamente o tamanho de partículas de óxido de zinco, consistiu no preenchimento do vaso de um moinho tipo atritor (Netzsch PE 075, Hanau am Main, Alemanha), utilizando 60% de seu volume e sendo ocupado por ZnO: H₂O na proporção 1:2 (m/m). Assim, foram vertidos no vaso 56 g de ZnO comercial (Votorantim Metais, SP, Brasil) para 112 mL de água destilada. Esferas de zircônia, com tamanho aproximado de 3 mm de diâmetro, foram incorporadas ao processo como meio moedor. A fim de minimizar o tamanho e homogeneizar as partículas, foi realizado o processo de moagem por 24 h sob a rotação de 2000 rpm, que foi a melhor condição previamente verificada. Após o término do processo de moagem, o material foi separado do meio moedor e levado à

estufa de circulação (Marconi) para secagem à 80°C, durante o período de 24 h. Após a síntese, os grânulos de NPZNOs foram armazenados em temperatura ambiente até o momento de caracterização.

2.3.5 Caracterização das NPZNOs

2.3.5.1 Análise por microscopia eletrônica de varredura

Nanopartículas de óxido de zinco foram dispersas em isopropanol, com auxílio de um banho de ultrassom e, em seguida, gotejadas sobre uma lâmina de silício. Após a secagem, o material foi aderido a um suporte de alumínio para a caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A captura de micrografias de MEV foi realizada usando um Microscópio Eletrônico de Varredura Field Emission JSM-6701F/JEOL, equipado com Espectroscopia de Dispersão de Energia (EDS), modelo 6742A (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts (EUA)).

2.3.5.2 Análise de tamanho e potencial zeta por espalhamento dinâmico da luz (DLS)

O tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta das nanopartículas de óxido de zinco foram obtidos através da técnica de Espalhamento Dinâmico da Luz (Dynamic Light Scattering- DLS) e análises de mobilidade eletroforética. Essas medições foram obtidas utilizando o equipamento Malvern 3000 Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido) (figura 13). As NPZNOs foram dispersas em meio de maturação suplementado com 10% de SFB, em concentrações de 0, 1,0 µg/mL e 1,5 µg/mL, com auxílio de um sonicador (Dr Hielscher Up 200 S ultrasonic homogeniser) (figura 14). Cada amostra foi analisada em triplicata. Os dados foram coletados e analisados utilizando o software Malvern Zetasizer 6.1



Figura 13: Equipamento e cubetas utilizados na técnica de Espalhamento Dinâmico da Luz e Potencial Zeta. À esquerda: Equipamento Malvern 3000 Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido), usado para análise de espalhamento da luz dinâmica (DLS). À direita, cubetas de vidro, utilizadas para medição da amostra.



Figura 14: Imagem de um sonicador, equipamento usado para dispersão das nanopartículas em meio líquido.

2.3.6 Seleção e maturação *in vitro* dos oócitos

Os complexos cumulus-oócitos foram obtidos de ovários provenientes de fêmeas bovinas de abatedouro local. O transporte dos ovários foi realizado em uma garrafa térmica com solução fisiológica aquecida, contendo antibióticos

(estreptomicina e penicilina) à 37°C. Os COCs foram recuperados a partir de folículos medindo 2-8 mm através de aspiração folicular. O fluido folicular foi examinado sob um estereoscópio e apenas aqueles que apresentavam cumulus compacto não atrésico, com mais de duas camadas de células e citoplasma homogêneo foram selecionados para o experimento. Os COCs foram maturados em grupos de 25 estruturas, em gotas de 100 µL, contendo um dos grupos experimentais representados na figura 12, diluídos em meio de maturação (TCM 199), suplementado com 10% de SFB, hormônios, antibióticos e piruvato de sódio. As gotas foram cobertas com óleo mineral (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA). As placas foram incubadas por 24 horas à 38,5°C, 5% de CO₂ em ar atmosférico e alta umidade. Cada condição experimental foi replicada sete vezes.

2.3.7 Fertilização e cultivo *in vitro* de embriões

Após 24 horas de maturação *in vitro*, os oócitos de cada grupo foram fecundados com sêmen, previamente selecionado, da raça holandesa. O sêmen foi testado previamente no laboratório e, durante todo o experimento, foi utilizada a mesma partida, de um único touro. As palhetas de sêmen foram descongeladas a 36,5°C por 30 segundos. O sêmen foi transferido para um gradiente percoll 45/90 e centrifugado a 3600 g por 7 minutos. Após a remoção do sobrenadante, o pellet foi ressuspenso em 700 µl de meio TCM199 tampão HEPES e centrifugado a 520 g por 5 minutos. Após a remoção do sobrenadante, o pellet foi coletado (50 µl) e ressuspenso em 70 µL de meio FIV (TALP-FIV com 0,6% de BSA). A fertilização *in vitro* foi realizada em gotas de 100 µl de meio Fert-TALP, suplementado com 2× 10⁶ espermatozoides, por cerca de 20 horas, em atmosfera umedecida de 5% de CO₂ e 38,8°C no ar. Os presumíveis zigotos foram parcialmente desnudados e cultivados em meio SOF suplementado com 1,5% de soro fetal bovino, forskolina (10µM) e L-carnitina (1mM), seguindo um protocolo previamente definido (Lima, M.R., 2015). O cultivo foi realizado em estufa incubadora a 38,5°C, 5% de O₂, 5% de CO₂, e umidade de 95%. A avaliação da taxa de clivagem foi realizada 72 horas após a fecundação, quando também foi realizado o feeding. A taxa de produção de blastocistos foi

avaliada no sétimo dia (D7), considerando a fecundação como D0. A classificação morfológica dos embriões foi realizada utilizando estereomicroscópio (Olympus, SZ40, Washington, EUA), segundo Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embrião (IETS). Em seguida, os blastocistos foram fixados com paraformaldeído a 4%, para avaliações posteriores.

2.3.8 Ensaio do acúmulo lipídico e determinação do número de células totais

Os embriões foram fixados no D7, em uma solução de paraformaldeído a 4% (v/v) a 4°C por 30 minutos e, em seguida, permeabilizados com Triton X-100 a 0,5% (v/v), ambos em tampão fosfato salina (PBS), por 5 minutos a 38,5°C. Em seguida, os embriões foram lavados duas vezes em solução de PBS com 1% de BSA. As estruturas foram coradas em gotas de Hoechst 33342 (1:100) e Bodipy 493/503 (1:50) por 1 hora à temperatura ambiente e, em seguida, examinadas sob um microscópio de epifluorescência em 350/461 (Hoechst) e 490/504 (Bodipy). Ambos são corantes fluorescentes, o Hoechst 33342 cora os núcleos, permitindo a visualização e contagem do número total de células presentes no embrião. O Bodipy 493/503 cora as gotículas lipídicas embrionárias (lipídios neutros). A intensidade da fluorescência do Bodipy 493/503 é proporcional ao acúmulo lipídico embrionário. Nosso grupo utilizou o protocolo descrito por Del Collado *et al.* (2017) com algumas adaptações. Os embriões foram montados em lâminas, e as imagens foram capturadas sob um microscópio EVOS M5000 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA). O acúmulo lipídico foi calculado pela razão entre a intensidade de fluorescência (média de pixels) da sonda e o número total de células nos blastocistos, retirando o background, após seleção manual da área de cada embrião, com auxílio do programa ImageJ (versão 1.53e). A relação entre a intensidade de fluorescência, a área total do embrião e o número total de células forneceram os resultados de acúmulo lipídico por embrião. Cerca de 20 a 30 embriões foram avaliados, por grupo, em 5 repetições. Todas as imagens foram capturadas sob as mesmas condições microscópicas com uma objetiva de 20X

2.3.9 Análise estatística

As proporções de embriões clivados e de blastocistos foram avaliadas pelo teste Qui-Quadrado (χ^2). A quantificação lipídica (lipídios totais) nos embriões foi comparada entre os grupos pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os resultados referentes ao número total de células (blastômeros) foram submetidos à análise de variância (ANOVA one-way) e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism, versão 9.4.1, ao nível de significância de 5%, a partir de um total de 5 repetições.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Caracterização das NPZNOs

As micrografias das NPZNOs por MEV revelaram que esses nanomateriais estão em nanoescala (figura 15).

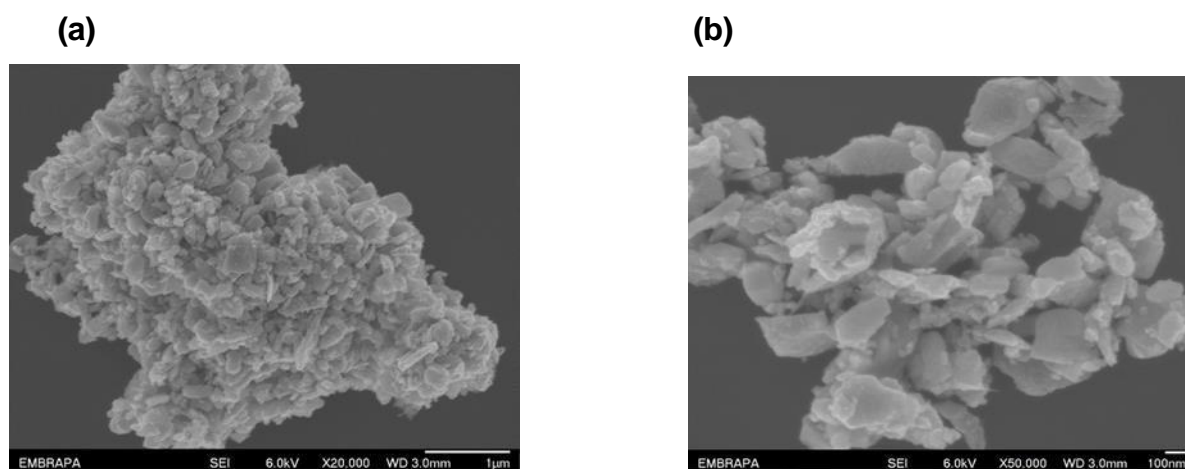


Figura 15 - Imagens de nanopartículas de óxido de zinco (NPZNOs) por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em diferentes escalas. (a) Ampliação de 20.000x. A barra de escala é de 1µm. (b) Ampliação de 50.000x. A barra de escala é de 100nm.

Os resultados correspondentes ao tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta das nanopartículas de óxido de zinco foram obtidos através da técnica de Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS) e estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Dados de NPZNOs no meio MIV obtidos pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS - Dynamic Light Scattering)

Análise	Unidade	Resultados
Diâmetro hidrodinâmico	nm	23,41 ± 0,49,41 (1,0 µg/mL)
		25,65 ± 0,140 (1,5 µg/mL)
Potencial zeta	mv	-11,37 ± 1,45 (100µg/mL)
Índice de Polidispersão	IP	0,438 ± 0,01 (1,0 µg/mL)
		0,620 ± 0,005 (1,5 µg/mL)
pH		7,4

nm: nanômetro; mV: millivolt; IP: índice de polidispersão, pH: potencial hidrogeniônico

Para investigar o raio hidrodinâmico e as cargas superficiais, as NPZNOs foram sonicadas e dispersas, homogeneamente, em meio MIV suplementado com SFB e antibióticos. Pode-se observar, por meio da avaliação do diâmetro hidrodinâmico, que as nanopartículas (NPs) dispersaram eficientemente (não formaram aglomerados) e apresentaram dimensões ideais para aplicações biológicas (até 100nm). Para avaliação do potencial zeta (carga superficial), as NPs foram preparadas em uma concentração de 100µg/mL, pois somente nessa concentração, as amostras exibiram uma qualidade satisfatória, levando em consideração o limite de detecção do equipamento. No entanto, o mesmo não ocorreu quando as NPs foram preparadas nas concentrações do experimento (figura 16).

(a)

Zeta Potential Report
v2.3

Malvern Instruments Ltd. © Copyright 2008

Sample Details

Sample Name: NP ZnO não lavadas 1,5mcg 1
SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: Carolina Capobiangio 09 Ma... Dispersant Name: Water
Record Number: 22 Dispersant RI: 1,330
Date and Time: segunda-feira, 9 de maio de 2... Viscosity (cP): 0,8872
Dispersant Dielectric Constant: 78,5

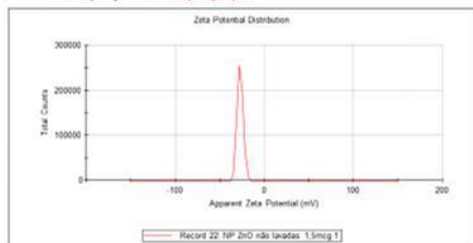
System

Temperature (°C): 25,0 Zeta Runs: 12
Count Rate (kcps): 41,8 Measurement Position (mm): 2,00
Cell Description: Clear disposable zeta c... Attenuator: 10

Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV):	-27,2	100,0	3,38
Zeta Deviation (mV):	3,38	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm):	0,00518	0,0	0,00

Result quality: See result quality report

Zeta Quality Report
v2.4

Malvern Instruments Ltd. © Copyright 2008

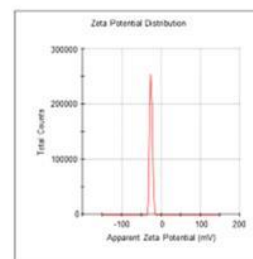
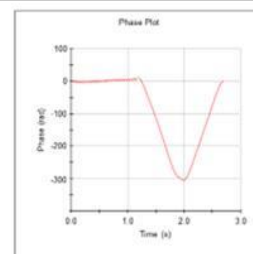
Sample Name: NP ZnO não lavadas 1,5mcg 1
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Carolina Capobiangio 09 Maio 22.dts
Record Number: 22
Measurement Date and Time: segunda-feira, 9 de maio de 2022 11:20:51

RESULT DOES NOT MEET QUALITY CRITERIA

Phase data good

Distribution data good

Reference beam count rate too low. If you see this warning for a number of Zeta Potential results then please contact your nearest Malvern representative.



(b)

Zeta Potential Report
v2.3

Malvern Instruments Ltd. © Copyright 2008

Sample Details

Sample Name: NP ZnO não lavadas 100mcg 1
SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: Carolina Capobiangio 09 Ma... Dispersant Name: Water
Record Number: 4 Dispersant RI: 1,330
Date and Time: segunda-feira, 9 de maio de 2... Viscosity (cP): 0,8872
Dispersant Dielectric Constant: 78,5

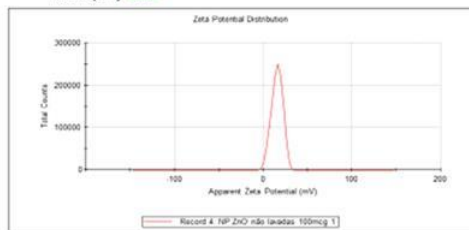
System

Temperature (°C): 25,0 Zeta Runs: 12
Count Rate (kcps): 272,5 Measurement Position (mm): 2,00
Cell Description: Clear disposable zeta c... Attenuator: 6

Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV):	15,3	100,0	6,40
Zeta Deviation (mV):	6,40	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm):	0,0100	0,0	0,00

Result quality: Good

Zeta Quality Report
v2.4

Malvern Instruments Ltd. © Copyright 2008

Sample Name: NP ZnO não lavadas 100mcg 1
SOP Name: mansettings.nano
File Name: Carolina Capobiangio 09 Maio 22.dts
Record Number: 4
Measurement Date and Time: segunda-feira, 9 de maio de 2022 10:19:19

RESULT MEETS QUALITY CRITERIA

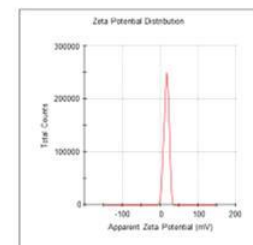
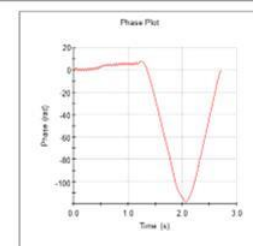


Figura 16: Resultado do potencial zeta nas concentrações de 1,5µg/mL(a), e 100µg/mL (b). (a) Os resultados não apresentaram qualidade; (b) Os resultados apresentaram qualidade. Medições obtidas através do equipamento Malvern 3000 Zetasizer Nano ZS e o software Malvern Zetasizer 6.12.

2.4.2 Efeitos das diferentes concentrações dos reguladores metabólicos e NPZNOs nas taxas de clivagem e de blastocistos

Os resultados deste estudo indicaram que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nas taxas de clivagem embrionária entre os grupos controle (81,7%), forskolina 10 μ M (75,7%) e forskolina 15 μ M (89,5%). No entanto, a taxa de desenvolvimento de blastocistos no dia 7 (dia zero = dia de FIV) foi maior ($p < 0,05$) no grupo controle (59,2%) em comparação aos grupos forskolina 10 μ M (42,1%) e 15 μ M (37,9%) (tabela 2).

Tabela 2 - Taxas de clivagem e formação de blastocistos após maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meio suplementado com forskolina nas seguintes concentrações: 0 (controle), 10 μ M e 15 μ M.

Grupos	Clivagem <i>n</i> (%)	Blastocisto <i>n</i> (%)
Controle	58/71 (81.7) ^{ab}	42/71 (59.2) ^a
10 μ M	81/107 (75.7) ^b	45/107 (42.1) ^b
15 μ M	85/95 (89.5) ^a	36/95 (37.9) ^b

Os valores a, b, c com diferentes sobrescritos entre as linhas na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$, Qui-quadrado). As taxas de clivagem e formação de blastocistos referem-se ao número total de oócitos (5 repetições).

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nas taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário entre os grupos controle, L-carnitina 2,5mM e L-carnitina 5,0 mM (Tabela 3).

Tabela 3 - Taxas de clivagem e formação de blastocistos após a maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meio suplementado com L-carnitina nas seguintes concentrações: 0 (controle), 2,5mM e 5mM.

Grupos	Clivagem <i>n</i> (%)	Blastocisto <i>n</i> (%)
Controle	82/87 (94.2)	49/87 (56.3)
2,5mM	96/113 (84.9)	50/113 (44.2)
5mM	91/109 (83.5)	45/109 (41.3)

As análises estatísticas foram realizadas com nível de significância de 5%, a partir de um total de 5 repetições.

Do mesmo modo, não houve diferença significativa ($p>0,05$) nas taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário entre os grupos controle, NPZNOs 1,0 μ g/mL e, NPZNOs 1,5 μ g/mL (tabela 4).

Tabela 4 - Taxas de clivagem e formação de blastocistos após a maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meio suplementado com nanopartículas de óxido de zinco (NPZNOs) nas seguintes concentrações: 0 (controle), 1,0 μ g/mL e 1,5 μ g/mL.

Grupos	Clivagem <i>n</i> (%)	Blastocisto <i>n</i> (%)
Controle	225/276 (81.5)	102/276 (36.9)
1.0 μ g/mL	219/298 (73.5)	108/288 (37.5)
1.5 μ g/mL	230/289 (79.5)	107/289 (37.0)

As análises estatísticas foram realizadas com nível de significância de 5%, a partir de um total de 5 Repetições

2.4.3 Efeitos das diferentes concentrações dos reguladores metabólicos e NPZNOs no acúmulo lipídico e número de células totais embrionárias

Os dados demonstraram que houve redução do acúmulo lipídico ($p<0,05$) nos seguintes tratamentos em comparação ao grupo controle: forskolina 10 μ M e L-canitina 2,5mM. Nenhuma das concentrações testadas para as NPZNOs apresentou diferenças no acúmulo lipídico em relação ao controle ($p>0,05$) (figuras 17, 18 e 19).

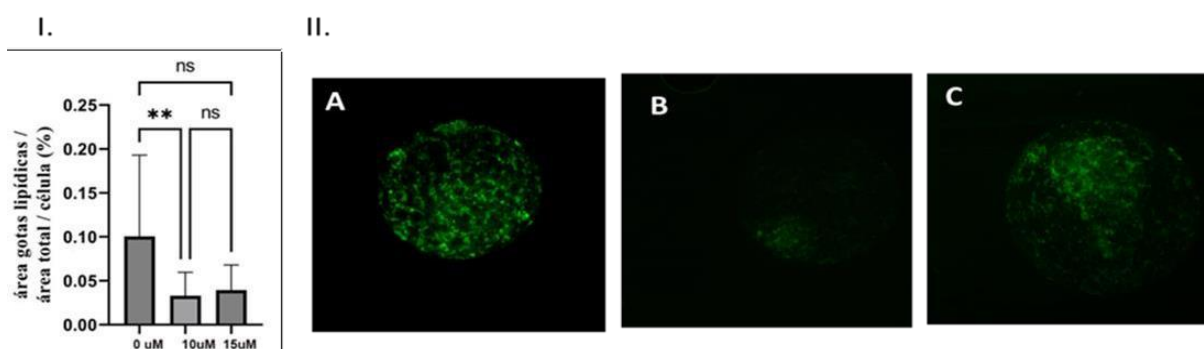


Figura 17: Suplementação com forskolina durante a maturação *in vitro*: efeitos nos níveis de lipídios de blastocistos bovinos. I. O gráfico mostra a área das gotículas lipídicas sobre a área total do embrião (%). II. Blastocistos corados com Bodipy 493/503: (A) Controle; (B) Forscolina 10 μ M; (C) Forscolina 15 μ M (aumento de 200x). Foram avaliados de 20 a 30 embriões por grupo.

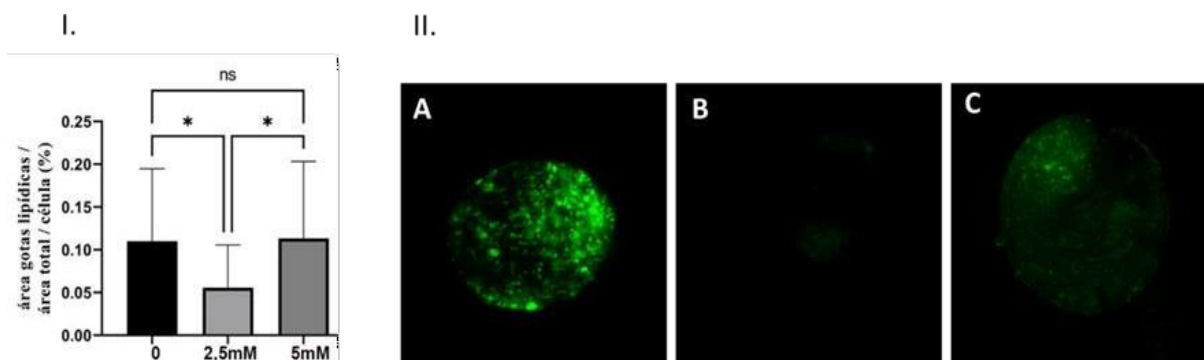


Figura 18: Suplementação com L-carnitina durante a maturação *in vitro*: efeitos nos níveis de lipídios dos blastocistos bovinos. I. O gráfico mostra a área das gotículas lipídicas sobre a área total do embrião (%). II. Blastocistos corados com Bodipy 493/503: A) Controle; (B) L-carnitina 2,5mM (C) L-carnitina 5,0mM (aumento de 200x). Foram avaliados de 20 a 30 embriões por grupo.

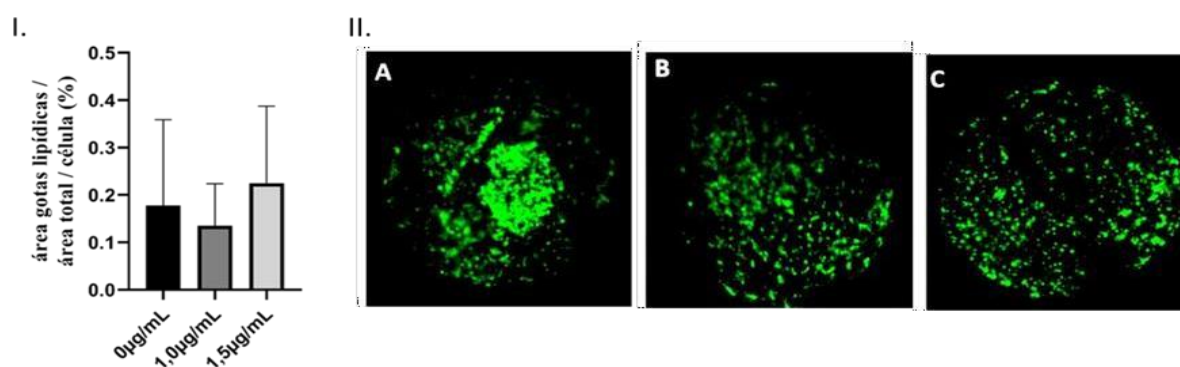


Figura 19: Suplementação com NPZNOs durante a maturação *in vitro*: efeitos nos níveis de lipídios dos blastocistos bovinos. I. O gráfico mostra a área das gotículas lipídicas sobre a área total do embrião (%). II. Blastocistos corados com Bodipy 493/503: A) Controle; (B) NPZNOs 1,0µg/mL; (C) NPZNOs 1,5µg/mL (aumento de 200x). NPZn-O, nanopartículas de óxido de zinco. Foram avaliados de 20 a 30 embriões por grupo.

Os tratamentos forskolina 15µM e NPZNOs 1,0 µg/mL, aumentaram o número de células totais ($p < 0,05$) em relação ao controle (figuras 20 e 22). Nenhuma das concentrações testadas para a L-carnitina apresentou diferenças significativas no número de células totais em relação ao controle ($p > 0,05$) (figura 21).

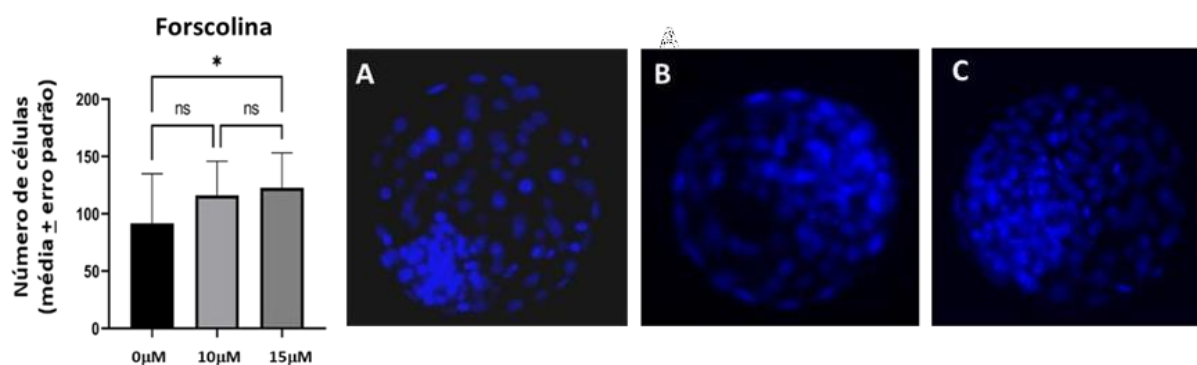


Figura 20: Efeito da forskolina no número total de células de blastocistos bovinos. I. O gráfico mostra que o tratamento de 15 μM aumentou significativamente ($p < 0,05$) o número total de células. II. Blastocistos corados com Hoecht 33342. A) Controle; (B) Forscolina 10 μM ; (C) Forscolina 15 μM (Aumento de 200x).

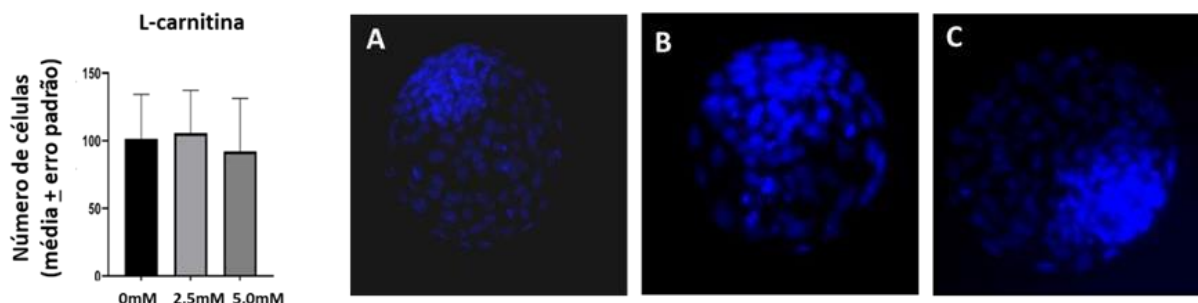


Figura 21: Efeito da L-carnitina no número total de células de blastocistos bovinos. I. O gráfico mostra que não houve diferença ($p > 0,05$) no número total de células entre os tratamentos. II. Blastocistos corados com Hoecht 33342. A) Controle; (B) L- carnitina 2,5 mM; (C) L-carnitina 5,0 mM (Aumento de 200x).

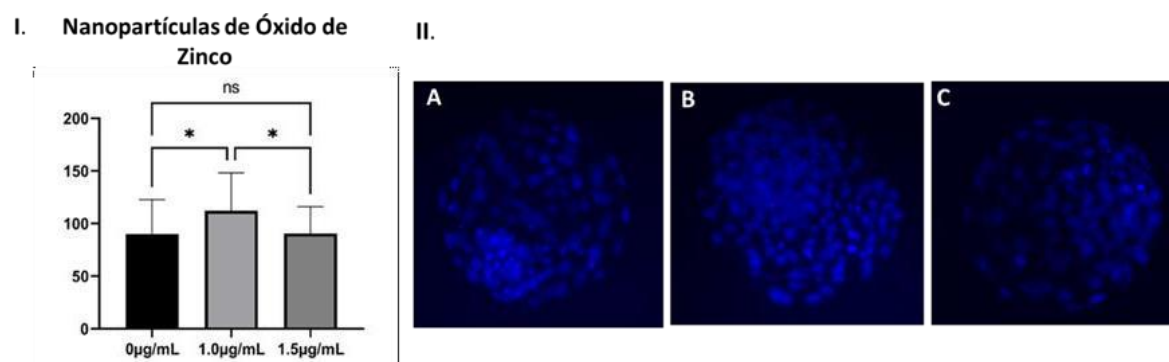


Figura 22: Efeito das NPZNOs no número total de células de blastocistos bovinos. I. O gráfico mostra que o tratamento de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ aumentou significativamente ($p < 0,05$) o número total de células. II. Blastocistos corados com Hoecht 33342. A) Controle; (B) NPZNOs 1,0 $\mu\text{g/mL}$; (C) NPZNOs 1,5 $\mu\text{g/mL}$. NPZNOs, nanopartículas de óxido de zinco (Aumento de 200x).

2.5 DISCUSSÃO

Sabe-se que o potencial de desenvolvimento de um blastocisto após a FIV depende, em grande parte da qualidade do oócito, sendo que, apenas 30 a 40% dos oócitos maturados *in vitro* alcançam o estágio de blastocisto (Aardema *et al.*, 2022). Entre os fatores associados à redução da qualidade de embriões PIV, o acúmulo e perfil lipídico embrionários, estão entre os mais estudados (Amstislavsky *et al.*, 2019; de Andrade Melo-Sterza; Poehland, 2021; Khan *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022).

A L-carnitina (Takahashi *et al.*, 2013; Held-Hoelker *et al.*, 2017; Carrillo-González, *et al.*, 2023) e a forskolina (Paschoal *et al.*, 2015; Paschoal *et al.*, 2016) são substâncias, que têm sido estudadas devido à sua capacidade em reduzir o conteúdo lipídico de oócitos e embriões bovinos e, por isso, têm sido testadas em diferentes estágios da PIVE, com o objetivo de melhorar a qualidade e viabilidade dos embriões em estágio pré-implantacional. Enquanto a L-carnitina favorece a beta oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias (Zolini *et al.*, 2019) a forskolina age ativando lipases endógenas via aumento da adenilato ciclase e do AMPc (Sanchez, *et al.*, 2013).

Em relação à forskolina, com exceção de Prates *et al.* (2012), que avaliaram a atividade de forskolina durante a MIV de oócitos suínos, e alguns estudos que utilizaram a forskolina no período pré-maturação (Razza *et al.*, 2018; Medina-Chávez *et al.*, 2021), esse é um dos poucos estudos que objetivaram avaliar o efeito desse agente lipolítico durante a etapa de maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

Nossos resultados mostraram uma redução no desenvolvimento embrionário quando a forskolina foi adicionada nas concentrações de 10 μ M e 15 μ M na MIV. Porém, na concentração de 10 μ M, observamos redução do acúmulo lipídico embrionário, e na concentração de 15 μ M, também ocorreu aumento do número de células totais do embrião.

Meneghel *et al.* (2017) testaram o efeito de quatro concentrações de forskolina (0, 2,5, 5,0 e 10 μ M) no CIV por 24 horas. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas nas taxas de blastocistos entre os grupos, a produção de embriões também foi menor no grupo forskolina 10 μ M. Por outro lado, Paschoal *et al.* (2012; 2017) testaram a mesma concentração de forskolina (10 μ M) e, apesar de não observarem efeito deletério na produção de embriões, também não houve

impacto no número de células totais, semelhante ao resultado encontrado em nosso trabalho.

Cuello *et al.* (2016), obtiveram resultados de lipólise e número total de células, semelhantes aos nossos, quando testaram o efeito da adição de 10 μM de forskolina no CIV de embriões suínos. Nesse trabalho, os autores confirmaram a ação da forskolina através do aumento da produção de glicerol no meio de cultivo. A forskolina induz potente ativação da adenilato ciclase, que por sua vez ativa uma lipase endógena através da via AMPc/proteína quinase, causando lipólise do triacilglicerol e liberação de glicerol. Portanto, a presença do glicerol no meio de cultivo pode ser considerado um indicativo da atividade lipolítica da forskolina (Warnick, 1986). Entretanto, Costa *et al.* (2019), ao testar as concentrações de 2,5 5,0 e 10 μM de forskolina no CIV, comprovaram ação lipolítica da forskolina somente nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM . Já Paschoal *et al.* (2017), apesar de também comprovarem ação lipolítica de 2,5 μM de forskolina, constataram que, embriões expostos ao meio CIV com o agente lipolítico nessa concentração, apresentaram maior proporção de células apoptóticas do que, quando cultivados em concentrações maiores de forskolina. Segundo Sanches *et al.* (2013), são observados efeitos controversos em relação à concentração ideal de forskolina na redução dos lipídios intracelulares.

Como no presente estudo a forskolina foi adicionada na MIV, possíveis explicações para seus efeitos prejudiciais no desenvolvimento embrionário, podem estar relacionadas à um atraso excessivo na retomada meiótica do oócito, devido ao aumento do AMPc (Rebecca; Thomas *et al.*, 2004) ou à um possível aumento de células apoptóticas, conforme já reportado por Paschoal *et al.* (2017), em estudo com concentrações menores de forskolina. O estudo de Prates *et al.* (2012), demonstraram que a suplementação de 10 μM de forskolina na MIV interferiu no progresso meiótico em oócitos suínos, suportando, portanto, uma de nossas hipóteses.

Segundo Rebecca; Thomas *et al.* (2004), tratamentos que mantêm ou elevam os níveis de AMPc nas células da cumulus, nos oócitos ou em ambos, podem atrasar a retomada meiótica. Em um processo perfeitamente controlado, essa ação *in vitro* é desejável, já que a maturação fisiológica de COCs bovinos, normalmente, é atrasada pelo aumento ou manutenção dos níveis de AMPc intra-oócito, ou pela indução do aumento de AMP nas células que circundam o oócito. Logo, estender o período da parada meiótica, utilizando inibidores meióticos, pode ser benéfico para que ocorra

sincronização entre a maturação nuclear e citoplasmática *in vitro* (Nogueira *et al.* 2006), essencial para assegurar a quantidade e qualidade dos embriões produzidos *in vitro*. Em alguns trabalhos, inclusive, a forskolina tem sido utilizada justamente por sua atividade moduladora de AMPc, que inibe a retomada imediata da meiose e permite ao oócito mais tempo para adquirir uma competência de desenvolvimento ótima (Razza *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2019). No entanto, de acordo com Bilodeau-Goeseels (2011), enquanto concentrações elevadas da forskolina induzem o bloqueio da meiose, reprimindo a ativação do fator promotor de maturação (MPF), uma dose baixa leva à ativação do MPF, quebra da vesícula germinativa e retomada da meiose, de modo que, é possível concluir que um aspecto importante é determinar a concentração ideal de forskolina, de acordo com cada condição experimental.

Paschoal *et al.* (2016) demonstrou que uma alta dose (100 μ M) de forskolina pode desencadear apoptose e danos no DNA, enquanto que o mesmo não ocorre em concentrações mais baixas (25 μ M).

Assim, devido à sua ação no aumento no AMPc, uma molécula sinalizadora, que regula várias funções fisiológicas (Seamon *et al.*, 1981; Ho; Shi 1982), com alguns efeitos celulares inespecíficos, é recomendável individualizar a dose de forskolina, de acordo com cada modelo experimental, pois é possível que ela possa induzir efeitos embrionários ainda desconhecidos.

A L-carnitina foi suplementada na MIV nas concentrações de 2,5mM e 5mM, segundo estudos prévios (Sutton Mcdowall *et al.*, 2012; Knitlova *et al.* 2017). Nessas concentrações, a L-carnitina não interferiu no desenvolvimento embrionário, no entanto, o tratamento de 2,5mM promoveu redução no acúmulo lipídico. Zolini e colaboradores (2019), também não observaram diferenças no desenvolvimento embrionário quando COCs foram maturados com ou sem 3,03 mM de L-carnitina. Já Knitlova *et al.* (2017) verificaram que a concentração de 2,5 mM de L-carnitina melhorou a taxa de blastocistos apenas quando foram utilizados oócitos oriundos de folículos pequenos (<5mm), considerados meioticamente menos competentes. Ao avaliarem a taxa de blastocistos derivados de oócitos de folículos médios (6-10 mm), classificados como 'meioticamente competentes', não constataram diferença no desenvolvimento embrionário, o que sinaliza para um possível benefício da L-carnitina apenas em oócitos menos competentes. Como em nosso estudo foram aspirados folículos de 2 a 8 mm, e obtidos oócitos de diferentes graus de maturidade, podemos

deduzir que o estágio de maturidade oocitária pode ter influenciado em nossos resultados com os tratamentos expostos à L-carnitina.

Em relação às taxas de desenvolvimento embrionário e acúmulo lipídico na espécie bovina, resultados semelhantes aos nossos foram encontrados por Held-Hoelker *et al.* (2017), porém, os autores utilizaram a L-carnitina no CIV. Já Carrillo-Gonzalez *et al.* (2019), não encontraram diferenças na taxa de desenvolvimento embrionário e no acúmulo lipídico quando a L-carnitina foi adicionada na concentração de 3,8mM na MIV. No entanto, no presente estudo, quando utilizada na concentração de 2,5 mM, a L-carnitina impactou na qualidade embrionária, através do aumento no número total de células. A variação de resultados encontrada na literatura, em relação aos efeitos da suplementação de L-carnitina na PIVE, pode ser atribuída às diferentes condições experimentais empregadas, pois normalmente é utilizada em diferentes etapas da PIVE, (apenas MIV ou CIV), sob variadas concentrações e em meios contendo diferentes suplementações protéicas.

Ainda, Baldoxeda *et al.* (2016) demonstraram efeitos raciais sobre a composição lipídica embrionária e interferência na resposta à L-carnitina durante o CIV (Baldoxeda *et al.*, 2016), comparando embriões das raças Holandesa e Jersey. Em seu estudo, a resposta à exposição à L-carnitina foi menor em embriões Jersey do que embriões da raça holandesa, demonstrando que a genética pode influenciar a resposta de embriões bovinos à estimulação do metabolismo mitocondrial. Uma limitação de nosso trabalho, foi a utilização de ovários de abatedouro, que não nos permitiu o controle sobre a interferência genética nos resultados, embora existam evidências crescentes, de que o ambiente de cultivo, pós-fertilização, seja o principal fator determinante da qualidade do blastocisto (Lonergan *et al.* 2003; Rizos *et al.* 2003).

Além da abordagem sobre o uso de agentes lipolíticos na MIV, nosso estudo também buscou utilizar estratégias para mitigação da lipoperoxidação, já que, normalmente, o processo *in vitro* desencadeia aumento de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente, estresse oxidativo.

De acordo com nosso conhecimento, esse é o primeiro trabalho que busca entender os efeitos das NPZNOs no conteúdo lipídico e estresse oxidativo, visando otimizar a criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Assim, como primeira parte desse estudo, este capítulo também teve como objetivo avaliar o efeito das NPZNOs durante a MIV no desenvolvimento embrionário, acúmulo lipídico e

número total de células embrionárias, como um indicativo de qualidade embrionária e resposta à estratégia para redução de lipoperoxidação.

Em poucas décadas, a nanotecnologia emergiu como uma estratégia promissora para resolver os impasses tecnológicos em várias áreas da ciência (Albanese *et al.*, 2012). Sua aplicação nos mais diversos campos é possível devido às propriedades físicas diversas que essas partículas assumem quando estão em nanoescala.

Segundo Albanese *et al.* (2012), para aplicações biológicas, o tamanho ótimo das nanopartículas seria entre 30 a 50 nm. No entanto, esses mesmos autores criticam os estudos que elucidam o efeito do diâmetro da nanopartícula na captação celular, porque, grande parte deles, foi conduzido em linhagens celulares imortalizadas. Como cada tipo de célula possui um fenótipo único, o tamanho ótimo das nanopartículas irá depender, entre outros fatores, da célula em questão, pois cada tipo de célula pode expressar diferentes receptores-alvo e diferentes vias de internalização. Em nosso trabalho, as NPs apresentaram um tamanho de $23,41 \pm 0,49$ nm, considerado ótimo para aplicações biológicas, apesar de observada a presença de tamanhos e morfologia heterogêneos (granular/circular), assim como formação de aglomerados, indicando coalescência das nanopartículas. Tal fato pode ser atribuído às concentrações dos precursores de zinco bem com a temperatura utilizada na síntese das NPs. Na literatura tem sido relatado a dificuldade na obtenção de NPZNOs com morfologia única (Talebian *et al.*, 2013).

Outra característica fundamental das NPs, que influencia diretamente sua atividade celular, é a sua carga superficial, cujo valor é fornecido pelo potencial zeta. O potencial zeta é a diferença entre o potencial elétrico da partícula, quando em movimento de cisalhamento, e o potencial elétrico da solução. Isso pode ser calculado ao avaliar a velocidade com que uma espécie carregada se desloca em direção ao eletrodo sob a influência de um campo elétrico externo (Lin *et al.*, 2014). Assim, o potencial zeta fornece informações sobre a estabilidade das nanopartículas em dispersão (Brar; Verma, 2011). Em termos gerais, o potencial zeta menor que -30 mV ou maior que +30 mV, sugere uma elevada estabilidade da suspensão. Em contrapartida, valores intermediários entre esses limites apontam para condições instáveis (Lin *et al.*, 2014), que podem resultar em processos de agregação, floculação ou coagulação das nanopartículas nas suspensões.

Devido ao limite de detecção do equipamento, no presente trabalho, as NPs foram preparadas na concentração de 100µg/mL e apresentaram um potencial zeta de $-11,37 \pm 1,45$, ou seja, um valor intermediário, tendo como base os valores de estabilidade. Assim, para evitar a agregação, as NPs eram dispersas em sonicador e diluídas em meio MIV no mesmo dia em que eram adicionadas no meio de maturação. Por outro lado, a presença do soro no meio de maturação teve um efeito positivo. Na presença de SFB, a carga superficial do nanomaterial é envolta por uma corona (camada proteica) composta por múltiplas proteínas. A interação das NPs com as proteínas do soro favorece a sua captação pelas células (Chithrani; Chan, 2007; Giljohann *et al.*, 2020). Assim, pode-se dizer que a interação das nanopartículas com as células é maior quando um grande número de proteínas está presente (Giljohann, *et al.*, 2020). No presente experimento, o meio MIV continha SFB, o que pode ter contribuído para favorecer essa interação.

Não identificamos diferença significativa no desenvolvimento embrionário, entre os grupos tratados com nanopartículas (1,0 e 1,5 µg/mL) e o controle. No entanto, Abdel-Halim; Helmy (2017) demonstraram uma maior taxa de desenvolvimento embrionário, quando NPZNOs 1 µg/mL foram adicionadas na MIV. Segundo Jahanbin *et al.* (2021), a adição de NPZNOs ao meio de MIV melhora o desenvolvimento embrionário por aumentar a atividade celular da enzima SOD e reduzir as taxas de apoptose. Como em nosso trabalho, utilizamos meios comerciais, otimizados para a PIVE, concluímos que a boa taxa de desenvolvimento embrionário do grupo controle (36,9%) contribuiu para a não diferenciação dos tratamentos com as NPZNOs. A diferença nos resultados, obtidos por diferentes grupos de pesquisa também pode ser atribuída tanto à qualidade e genótipo dos oócitos como à fisiologia e estado reprodutivo dos animais, cujos ovários foram coletados.

No entanto, embriões tratados com NPZNOs 1 µg/mL apresentaram um maior número de células totais, em relação aos demais grupos. Esse foi um resultado positivo visto que o número de células embrionárias tem sido utilizado como indicador do potencial de desenvolvimento do embrião (Iwasaki *et al.*, 1990; Mori *et al.*, 2002). Segundo Desai *et al.* (2000), o número de células totais representa um forte indício da viabilidade embrionária e resultados de prenhez.

Em relação ao acúmulo lipídico, as NPZNOs não apresentaram diferença em relação ao controle e não foram encontrados outros resultados semelhantes na literatura. Tendo como base o trabalho de Isaac, *et al.* (2017), é possível que o efeito

benéfico das NPZNOs frente ao acúmulo lipídico esteja na redução da peroxidação lipídica, devido às suas propriedades antioxidantes. Assim, a capacidade das nanopartículas em neutralizar essas espécies reativas, pode vir a contribuir na prevenção da oxidação dos lipídios presentes nas membranas celulares dos embriões.

A fim de comprovar os efeitos benéficos das nanopartículas de óxido de zinco, um trabalho recente (Kandil *et al.*, 2023) comparou a atividade do zinco puro e na forma de nanopartícula. Os pesquisadores constataram melhores resultados na maturação e no desenvolvimento *in vitro* de embriões de búfalos, nos tratamentos com as nanopartículas. Esse efeito pode ser relacionado à maior capacidade dos nanomateriais de interagirem com as células. Assim, nesse estudo, um dos poucos existentes nessa temática, as NPZNOs foram utilizadas como uma maneira promissora de aumentar as propriedades positivas do zinco, já que esse mineral atua como co-fator de enzimas importantes presentes nos embriões em estágio pré-implantacional (Picco *et al.*, 2010).

Uma vez que a taxa de blastocistos em si não revela muito sobre a qualidade intrínseca do embrião (Held- Hoelke *et al.*, 2017), o acúmulo lipídico e o número total de células podem consistir em bons parâmetros para avaliar a viabilidade de suplementação de uma molécula nos meios de produção embrionários. Seguindo esse raciocínio, as concentrações dos reguladores metabólicos e NPZNOs que contribuíram para os melhores resultados em relação ao acúmulo lipídico e número de células totais embrionários, foram selecionados para o experimento seguinte, apresentado no capítulo 2.

2.6 CONCLUSÕES

Os reguladores metabólicos L-carnitina e forskolina foram capazes de reduzir o acúmulo lipídico em embriões bovinos produzidos *in vitro*, nas concentrações de 2,5 mM e 10 μ M, respectivamente, apesar de não aumentarem as taxas de desenvolvimento.

A forskolina e as NPZNOs, nas concentrações definidas em nossas condições, podem contribuir para o aumento do número total de células, sendo esse um fator, comumente associado à viabilidade embrionária.

2.7 REFERÊNCIAS

AARDEMA, H. et al. Fatty acid supplementation during in vitro embryo production determines cryosurvival characteristics of bovine blastocysts. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 10, p. 837405, 2022.

ABE, H. et al. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Molecular Reproduction and Development*, v. 61, p. 57-66, 2002.

ABDEL-HALIM, B. R.; HELMY, N. A. Effect of nano-selenium and nano-zinc particles during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Animal Production Science*, v. 58, n. 11, p. 2021-2028, 2017.

ALBANESE, A.; TANG, P. S.; CHAN, W. C. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 14, p. 1-16, 2012. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071811-150124.

AMSTISLAVSKY, S. et al. Influence of cellular lipids on cryopreservation of mammalian oocytes and preimplantation embryos: a review. *Biopreservation and Biobanking*, v. 17, n. 1, p. 76-83, 2019.

BALDOCEDA, L. et al. Genetic influence on the reduction in bovine embryo lipid content by L-carnitine. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 28, n. 8, p. 1172-1184, 2016.

BARCELÓ-FIMBRES, M.; SEIDEL JR., G. E. Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, v. 74, p. 1406-1418, 2007.

BARUSELLI, P. S. et al. Challenges to increase the AI and ET markets in Brazil. *Anim Reprod*, 2019;16:364–75.

BLONDIN, P. Status of embryo production in the world. *Animal Reproduction (AR)*, v. 12, n. 3, p. 356-358, 2018.

BOHOLM, M.; BOHOLM, A. The many faces of nano in newspaper reporting. *J. Nanopart. Res.*, v. 14, n. 2, p. 1-18, 2012.

BRAR, S. K.; VERMA, M. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 30, n. 1, p. 4-17, 2011.

CARRILLO-GONZALEZ, D. F. et al. Effect of L-carnitine supplementation during in vitro maturation and in vitro culture on oocyte quality and embryonic development rate of bovines. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, v. 8, n. 6, p. 289-296, 2019.

CARRILLO-GONZÁLEZ, D. F.; RODRÍGUEZ-OSORIO, N.; LONG, C. R.; VÁSQUEZ-ARAQUE, N. A.; MALDONADO-ESTRADA, J. G. L-carnitine supplementation during in vitro maturation and in vitro culture does not affect the survival rates after vitrification

and warming but alters Inf-T and ptgs2 gene expression. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 16, p. 5601, 2020.

CARRILLO-GONZÁLEZ, Diego F. et al. O papel da L-carnitina no metabolismo embrionário bovino. Uma revisão do efeito da suplementação com um modulador metabólico na produção in vitro de embriões. *Biociencia Animal*, v. 34, n. 2, p. 413-423, 2023.

CHITHRANI, B. D.; CHAN, W. C. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.*, v. 7, p. 1542-1550, 2007.

COSTA, C. B. et al. Influence of forskolin supplementation on embryos produced in vitro. *Livestock Science*, v. 221, p. 15–18, 2019.

CUELLO, C. et al. Effect of MEM vitamins and forskolin on embryo development and vitrification tolerance of in vitro-produced pig embryos. *Animal Reproduction Science*, v. 136, n. 4, p. 296-302, 2013.

CUELLO, C. et al. Effective vitrification and warming of porcine embryos using a pH-stable, chemically defined medium. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 33915, 2016.

DE ANDRADE MELO-STERZA, F.; POEHLAND, R. Lipid metabolism in bovine oocytes and early embryos under in vivo, in vitro, and stress conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 7, p. 3421, 2021.

DE CAMARGO, J. et al. Evaluation of a serum-free culture medium for the enhanced vitrification cryosurvival of bovine in vitro-derived embryos. *Livestock Science*, v. 260, p. 104922, 2022.

DESAI, N. N. et al. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Human Reproduction*, v. 15, n. 10, p. 2190-2196, 2000.

GILJOHANN, D. A. et al. Oligonucleotide loading determines cellular uptake of DNA-modified gold nanoparticles. In *Spherical Nucleic Acids*, p. 413-423, 2020.

HO, R. J.; SHI, Q. H. Forskolin as a novel lipolytic agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 107, p. 157-164, 1982.

KNITLOVA, D. et al. Supplementation of l-carnitine during in vitro maturation improves embryo development from less competent bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 102, p. 16-22, 2017.

HELD-HOELKER, E. et al. Cryosurvival of in vitro produced bovine embryos supplemented with l-Carnitine and concurrent reduction of fatty acids. *Theriogenology*, v. 96, p. 145-152, 2017.

HOSSEINI, S. M. et al. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important? *Journal of assisted reproduction and genetics*, v. 26, p. 355-364, 2009.

ISAAC, A. V. et al. Supplementing zinc oxide nanoparticles to cryopreservation medium minimizes the freeze-thaw-induced damage to spermatozoa. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 494, n. 3-4, p. 656-662, 2017.

IWASAKI, S. et al. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. *Reproduction*, 1990; 90:279–284. [DOI: 10.1530/jrf.0.0900279] [PMID: 2231548]

JIANG, W. J. et al. L-carnitine prevents bovine oocyte aging and promotes subsequent embryonic development. *Journal of Reproduction and Development*, v. 65, n. 6, p. 499-506, 2019.

KANDIL, O. M. et al. Effect of Zinc and Nano Zinc on Developmental Competence of Buffalo Oocytes. *Journal of Advanced Veterinary Research*, v. 13, n. 3, p. 474-478, 2023.

KHAN, R. et al. Role of lipid metabolism and signaling in mammalian oocyte maturation, quality, and acquisition of competence. *Frontiers in cell and developmental biology*, v. 9, p. 639704, 2021.

LIMA, M. R. D. Efeitos de reguladores do metabolismo lipídico no desenvolvimento in vitro de embriões bovinos e na sobrevivência à vitrificação. 2015.

LIN, P. C. et al. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnol Adv*, v. 32, n. 4, p. 711-726, 2014.

LIU, T. et al. Lipid metabolic process involved in oocyte maturation during folliculogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 10, p. 806890, 2022.

LONERGAN, P. et al. Oocyte and embryo quality: Effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Domest Anim*, v. 38, p. 259-267, 2003.

LÓPEZ-DAMIÁN, EP et al. Gotículas lipídicas em aglomerados afetam negativamente os embriões *Bos indicus* durante a criopreservação. *Anatomia, histologia, embriologia*, v. 47, n. 5, p. 435-443, 2018.

MEDINA-CHÁVEZ, D.-A. et al. cAMP modulators before in vitro maturation decrease DNA damage and boost developmental potential of sheep oocytes. *Animals*, v. 11, n. 9, p. 2512, 2021.

MENEGHEL, M. et al. Lipid content and cryotolerance of in vitro-produced bovine embryos treated with forskolin before vitrification. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 37, p. 395–400, 2017.

MISHRA, A. et al. L-carnitine mediated reduction in oxidative stress and alteration in transcript level of antioxidant enzymes in sheep embryos produced in vitro. *Reprod Domest Anim*, v. 51, p. 311, 2016.

MORI, M., OTOI, T., SUZUKI, T. Correlation between the Cell Number and Diameter in Bovine Embryos Produced In Vitro. *Reprod Domest Anim*, v. 37, p. 181-184, 2002.

MUELLER, M. L., & VAN EENENNAAM, A. L. Synergistic power of genomic selection, assisted reproductive technologies, and gene editing to drive genetic improvement of cattle. *CABI Agriculture and Bioscience*, v. 3, n. 1, p. 13, 2022.

NOGUEIRA, D. et al. Meiotic arrest in vitro by phosphodiesterase 3-inhibitor enhances maturation capacity of human oocytes and allows subsequent embryonic development. *Biol Reprod*, v. 74, p. 177-184, 2006.

PASCHOAL, D. M. et al. Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. *Zygote*, v. 22, p. 146-157, 2012.

PASCHOAL, D. M. et al. Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. *Zygote*, v. 22, n. 2, p. 146-157, 2014.

PASCHOAL, D. M. et al. Decreased lipid granules of in vitro produced bovine embryos with low concentrations of forskolin. *Anim. Reprod.*, v. 12, p. 686, 2015.

PASCHOAL, D. M. et al. In vitro embryos production after oocytes treatment with forskolin. *Zygote*, v. 24, n. 2, p. 161-171, 2016.

PASCHOAL, D. M. et al. Cell apoptosis and lipid content of in vitro-produced, vitrified bovine embryos treated with forskolin. *Theriogenology*, v. 87, p. 108-114, 2017.

PICCO, S. J. et al. Effect of increasing zinc sulfate concentration during in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 74, n. 7, p. 1141-1148, 2010.

PITANGUI-MOLINA, C.P. et al. Effect of soybean phosphatidylcholine on lipid profile of bovine oocytes matured in vitro. *Chem. Phys. Lipids*, v. 204, p. 76–84, 2017. [DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2017.03.003]

PRATES, E.G. et al. Fat area and lipid droplets morphology of porcine oocytes during in vitro maturation with trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid (t10,c12 CLA) and forskolin. *Animal*, v. 7, n. 4, p. 602-609, 2012.

RAZZA, E. M. et al. Treatment with cyclic adenosine monophosphate modulators prior to in vitro maturation alters the lipid composition and transcript profile of bovine cumulus–oocyte complexes and blastocysts. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 30, n. 10, p. 1314-1328, 2018.

REBECCA E. THOMAS, DAVID T. ARMSTRONG, ROBERT B. GILCHRIST. Bovine Cumulus Cell-Oocyte Gap Junctional Communication During In Vitro Maturation in Response to Manipulation of Cell-Specific Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Levels. *Biology of Reproduction*, v. 70, n. 3, p. 548–556, 2004.

RIZOS, D. et al. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod*, v. 68, p. 236-243, 2003.

SANCHES, B. V. et al. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology*, v. 80, p. 372-377, 2013.

SATA, R. H. et al. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic development. *J Reprod Dev*, v. 45, n. 1, p. 97-103, 1999.

SEAMON, K.; DALY, J.W. Activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin does not require the guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem*, v. 256, p. 9799–9801, 1981.

SUDANO, M. J. et al. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*, v. 75, p. 1211-1220, 2011.

SUDANO, M. J. et al. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro-and in vivo-produced blastocysts. *Biology of reproduction*, v. 87, n. 6, p. 130-1, 2012.

SUTTON-MCDOWALL, M. L. et al. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*, v. 77, n. 8, p. 1632-1641, 2012.

TAKAHASHI, T. et al. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 25, n. 4, p. 589-599, 2013.

TALEBIAN, N. et al. Controllable synthesis of ZnO nanoparticles and their morphology-dependent antibacterial and optical properties. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 120, p. 66-73, 2013.

VIREQUE, A. A. et al. Effects of n-6 and n-3 polyunsaturated acid-rich soybean phosphatidylcholine on membrane lipid profile and cryotolerance of human sperm. *Fertil Steril*, v. 106, p. 273–283, 2016. [DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.03.044]

ZOLINI, A. M. et al. Effect of addition of L-carnitine to media for oocyte maturation and embryo culture on development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*, v. 133, p. 135-143, 2019.

ZULLO, G. et al. L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine in vitro–produced embryos. *Theriogenology*, v. 85, n. 4, p. 688-697.

WARNICK, G. R. Métodos enzimáticos para quantificação de lipídios lipoprotéicos. Em *Métodos em Enzimologia* (Vol. 129, pp. 101-123). Imprensa Acadêmica, 1986.

WU, L. L. Y.; NORMAN, R. J.; ROBKER, R. L. The impact of obesity on oocytes: evidence for lipotoxicity mechanisms. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 24, n. 1, p. 29-34.

3 CAPÍTULO 2: EFEITOS DOS REGULADORES METABÓLICOS E NPZNS NA CRIOSOBREVIVÊNCIA, ATIVIDADE MITOCONDRIAL E NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

3.1 INTRODUÇÃO

A criopreservação é uma importante biotecnologia reprodutiva, não apenas para a manutenção das características genéticas embrionárias (Ferré *et al.*, 2020b; Sanches *et al.*, 2017), mas também para superação dos desafios logísticos associados à transferência de embriões. Apesar de melhorias contínuas no cultivo *in vitro* e nos protocolos de congelação/vitrificação, a taxa de criosobrevivência dos embriões produzidos *in vitro*, ainda é significativamente menor em comparação àqueles produzidos *in vivo* (Viana, 2018; Marsico *et al.*, 2019). A escassez de resultados consistentes de taxas de criosobrevivência afeta a escolha dos profissionais de transferência de embriões, que ainda optam por transferir embriões frescos (Ferré *et al.*, 2020b). Outros problemas relacionados às baixas taxas de criosobrevivência são os custos adicionais excessivos e as perdas de embriões de genética superior, limitando o uso generalizado desse método e o progresso genético anual alcançável (De Sousa *et al.*, 2017).

Ao analisarmos a produção de embriões no ano de 2019, de acordo com as estatísticas anuais da IETS, cerca de 72% dos embriões produzidos no mundo foram embriões produzidos *in vitro*. Atualmente, segundo Valente *et al.* (2022), aproximadamente 33% dos embriões produzidos *in vitro* são criopreservados, enquanto para os embriões produzidos *in vivo*, a taxa ultrapassa 50%, o que sinaliza a necessidade de avanços na criopreservação de embriões PIV.

Apesar dos avanços do sistema de produção *in vitro*, ainda não é possível obter a mesma qualidade dos embriões gerados naturalmente. A qualidade inferior dos embriões produzidos *in vitro* (PIV) está associada às características como presença de vacúolos, poucas conexões intercelulares, alterações na expressão genética e no metabolismo lipídico (Lonergan *et al.*, 2001; De Andrade Melo-Sterza; Poehland, 2021), além de uma zona pelúcida mais frágil e uma maior incidência de anomalias cromossômicas (Khurana; Niemann, 2000).

As tentativas de aprimorar os resultados de criosobrevivência embrionária têm se concentrado, principalmente, na alteração da composição dos embriões, especialmente, na concentração e perfil de lipídios, de modo a torná-los mais resilientes ao congelamento. De acordo com Janati *et al.* (2021) e Valente *et al.* (2022), as principais diferenças entre os embriões de origens diferentes (*in vivo* x *in vitro*) são consequência de alterações metabólicas que afetam a composição lipídica embrionária.

Vários métodos têm sido aplicados para diminuir o teor lipídico em oócitos e embriões produzidos *in vitro*, como a centrifugação, a micromanipulação e a delipidação com agentes químicos (Panyaboriban *et al.*, 2018). A suplementação com os agentes de delipidação consiste em um método simples e pouco invasivo (Raza *et al.*, 2021) e, por isso, é alvo de estudos de diversos grupos de pesquisa (Held-Hoelker *et al.*, 2017; Meneguel *et al.*, 2017; Zolini *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2019; Raza *et al.*, 2021; Carrilo-González *et al.*, 2023).

O presente estudo teve como objetivo estudar aspectos ligados à qualidade do embrião produzido *in vitro* exposto a reguladores metabólicos, e para isso, utilizou diferentes vias de ação, com a L-carnitina e a forskolina, mais especificamente, que possuem distintos mecanismos de ação na redução do acúmulo lipídico e na criosobrevivência embrionária. Embora os efeitos da L-carnitina (Held-Hoelker *et al.*, 2017; Ghanem *et al.*, 2022; Zolini *et al.*, 2019) e da forskolina (Prates *et al.*, 2012; Sanches *et al.*, 2013; Raza *et al.*, 2021) sejam amplamente descritos na literatura, muitos resultados apresentam-se controversos (Carrilo-González *et al.*, 2020) e poucos estudos avaliam a qualidade de embriões reaquecidos após a vitrificação. Quando essas análises são realizadas, os principais focos costumam ser a avaliação de apoptose (Oliveira, *et al.*, 2022) e a contagem do número total de células (Paschoal *et al.*, 2017).

No entanto, os mecanismos envolvidos na criosobrevivência são complexos e estão longe de serem completamente elucidados (Valente *et al.*, 2022). De acordo com Sudano *et al.* (2016), a ineficiência da β -oxidação, bem como a disfunção mitocondrial, promovem a geração de espécies reativas de oxigênio que, conseqüentemente, causam danos ao DNA e prejudicam o desenvolvimento embrionário. Assim, a gravidade dos danos causados pelas técnicas de congelação varia, consideravelmente, e depende de fatores como a espécie, estágio de desenvolvimento e a origem dos embriões, *in vivo* ou *in vitro* (Dalcin; Lucci, 2010).

Características estruturais e bioquímicas, tais como elevado teor de lipídios, diminuição no número de mitocôndrias ativas e aumento do espaço perivitelino, podem estar relacionadas à menor qualidade e criosobrevivência dos embriões produzidos *in vitro* (Abe *et al.*, 2002; Rizos *et al.*, 2003).

Assim, determinar estratégias que aumentem a criotolerância, a partir do conhecimento dos seus efeitos em aspectos importantes do metabolismo embrionário, como atividade mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio, auxiliará na tomada de decisão quanto a escolha do protocolo de criopreservação mais adequado.

Ainda, sabe-se que a deficiência de zinco no organismo está relacionada ao aumento do estresse oxidativo, uma vez que o zinco atua como cofator de enzimas antioxidantes (Colagar *et al.*, 2009). No entanto, muitos pesquisadores estão optando por utilizar o zinco na forma de nanopartículas devido à sua maior biodisponibilidade e menor toxicidade (Dawei *et al.*, 2009). Além disso, as nanopartículas também possuem características específicas, como grande área superficial e tamanho reduzido, o que lhes confere propriedades de ligação e reatividade únicas (Zhandi *et al.*, 2020).

A possibilidade de aplicação das NPs em diferentes áreas (Kumar *et al.*, 2023) tem estimulado o interesse da comunidade científica e impulsionado seu crescimento nas últimas cinco décadas (Omietimi, *et al.*, 2023). No desenvolvimento embrionário *in vitro*, foram relatados efeitos de NPZNOs em bovinos (Picco *et al.* 2010; Abdel-Halim; Helmy, 2017) e búfalos (Kandil *et al.* 2023), no entanto, a maioria dos trabalhos publicados estão relacionados aos seus efeitos crioprotetores na criopreservação do sêmen, de diferentes espécies (Isaac *et al.*, 2017; Soltani *et al.*, 2023; Farhadi *et al.*, 2022; Khalique *et al.*, 2023). Nesse contexto, foi demonstrado que a suplementação de nanopartículas de óxido de zinco em soluções crioprotetoras resultou em melhorias na integridade da membrana plasmática (Jahanbin *et al.*; 2021) e na redução da peroxidação lipídica de espermatozoides bovinos (Yazdanshenas *et al.*, 2016). Outros trabalhos demonstram que a suplementação de NPZNOs em soluções crioprotetoras aprimora o perfil antioxidante pós-descongelamento e a motilidade dos espermatozoides em outras espécies como ovinos (Heidari I *et al.*, 2019; Fadl *et al.*, 2022), caprinos (Abedin *et al.*, 2023) e camélídeos (Shahin *et al.*, 2020).

De acordo com Hashem; Gonzalez-Bulnes (2020), o efeito das NPs na preservação da atividade das células espermáticas durante a criopreservação reside em suas propriedades antioxidantes, sendo este também, o seu efeito mais promissor. No

entanto, os estudos envolvendo a utilização das nanopartículas na criopreservação de oócitos e embriões ainda são poucos em comparação com aqueles relacionados à criopreservação de espermatozoides (Choi; Jang, 2022).

As mitocôndrias desempenham um papel fundamental na produção de energia celular por meio da fosforilação oxidativa e geração de ATP. No entanto, durante esse processo, também podem ser geradas espécies reativas de oxigênio como subprodutos. Quando a atividade mitocondrial se mantém equilibrada, a produção de ERO é controlada e não causa danos significativos às células embrionárias. Contudo, em situações de estresse oxidativo, o seu acúmulo excessivo pode resultar em danos aos lipídios, proteínas e DNA, com conseqüente comprometimento à viabilidade embrionária (Podolak *et al.*, 2022).

Considerando que não foram encontrados relatos na literatura sobre o impacto das NPZNOs em relação ao estresse oxidativo e atividade mitocondrial em embriões bovinos, reaquecidos após a vitrificação, e visando a continuidade de um cenário promissor para a utilização de embriões produzidos *in vitro* nos próximos anos, é crucial que esforços de pesquisa se concentrem, tanto no aprimoramento da qualidade dos embriões produzidos como na redução dos custos, inerentes às técnicas, de modo a torná-las, economicamente, cada vez mais viável aos produtores (Marsico *et al.*, 2019). Esse é o caminho mais seguro para o sucesso das transferências embrionárias após procedimentos de congelamento e reaquecimento.

Assim, dada a importância dessas avaliações, no presente estudo foram analisados os efeitos dos tratamentos: L-carnitina 2,5 mM, forskolina 10 μ M e NPZNOs 1 μ g/mL, previamente selecionados a partir dos resultados do capítulo 1, na criosobrevivência embrionária, atividade mitocondrial e produção de ERO, a fim de definir uma estratégia de criopreservação visando à melhoria de parâmetros que podem impactar na qualidade embrionária.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos de reguladores metabólicos e NPZNOs, durante a MIV, na criosobrevivência embrionária, atividade mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio.

3.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da adição na MIV de L-carnitina 2,5 mM, forskolina 10 μ M e NPZNOs 1 μ g/mL nas taxas de expansão, após 2h, 24h e 48h e de eclosão após 24h e 48h, de embriões bovinos submetidos à vitrificação, em comparação ao grupo controle;
- Analisar o efeito da adição na MIV de L-carnitina 2,5 mM, forskolina 10 μ M e NPZNOs 1 μ g/mL na produção de espécies reativas de oxigênio, de embriões bovinos produzidos *in vitro*, em comparação ao grupo controle;
- Examinar o efeito da adição na MIV de L-carnitina 2,5 mM, forskolina 10 μ M e NPZNOs 1 μ g/mL na atividade mitocondrial de embriões bovinos produzidos *in vitro*, reaquecidos, em comparação ao grupo controle.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Delineamento experimental

A partir dos resultados apresentados no capítulo 1, foi selecionado um tratamento de cada substância, que foi adicionado na MIV, resultando em quatro grupos experimentais: 1) Controle (sem adição de reguladores metabólicos e NPZNOs); 2) Meio MIV com NPZNOs 1,0µg/mL; 3) Meio MIV com L-carnitina 2,5mM; 4) Meio MIV com Forscolina 10µM. Em seguida à maturação, os oócitos foram fertilizados e cultivados *in vitro* até o D7, quando os blastocistos foram vitrificados. Posteriormente, os embriões foram reaquecidos e cultivados por 48h, nas mesmas condições de cultivo anteriores. As taxas de expansão foram calculadas 2h, 24h e 48h e as taxas de eclosão 24h e 48h, após a descongelação. Com 48h do reaquecimento, os blastocistos foram corados para avaliação da atividade mitocondrial e produção de radicais livres. Após a coloração, os embriões foram fixados em paraformaldeído 4% e montados em lâmina. Em seguida, foram fotografados e as imagens foram analisadas no software Image J (figura 23).

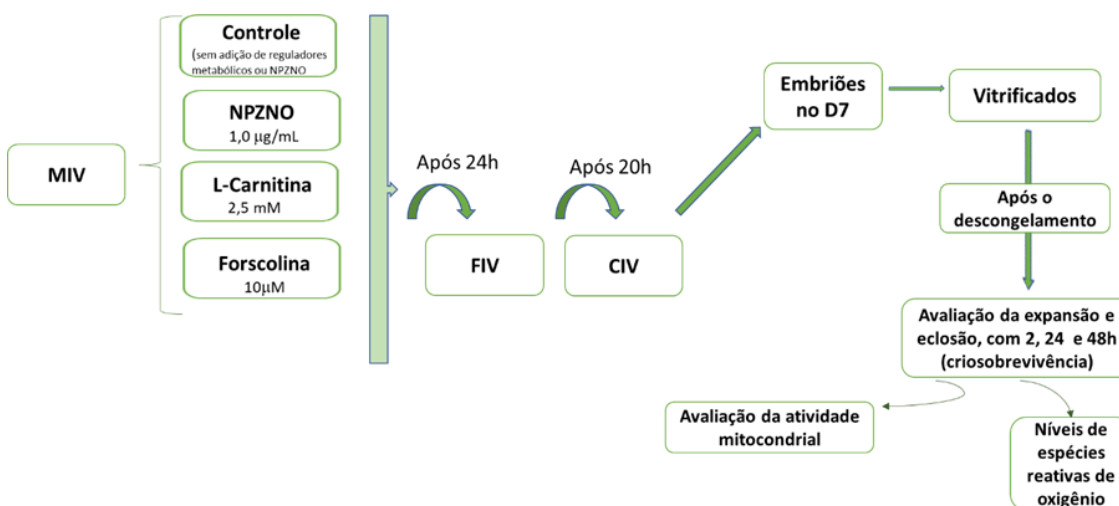


Figura 23: Representação esquemática do delineamento do experimento do capítulo 2.

3.3.2 Seleção e maturação *in vitro* dos oócitos

Os COCs utilizados neste estudo foram obtidos a partir dos ovários provenientes de fêmeas bovinas de abatedouro local. Os ovários foram transportados em uma garrafa térmica com solução fisiológica aquecida contendo antibióticos (estreptomicina e penicilina) à 37°C. Os COCs foram recuperados a partir de folículos medindo 2-8 mm através de aspiração folicular. O fluido folicular foi examinado sob um estereoscópio e apenas os COCs que apresentavam cumulus compacto não atrético, com mais de duas camadas de células e citoplasma homogêneo foram selecionados para o experimento. Os COCs foram então submetidos à maturação em grupos de 25 estruturas, em gotas de 100 µL, contendo um dos grupos experimentais representados na figura 23. O meio de maturação TCM 199 foi suplementado com 10% de soro fetal bovino, hormônios, antibióticos e piruvato de sódio e as gotas cobertas com óleo mineral (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA). As placas contendo os COCs foram incubadas por 24 horas à 38,5°C, 5% de CO₂ em ar atmosférico e alta umidade. Cada condição experimental foi replicada sete vezes.

3.3.3 Produção *in vitro* dos embriões

Após 24 horas de maturação *in vitro*, os oócitos de cada grupo foram fecundados utilizando sêmen previamente selecionado de touros da raça holandesa. O sêmen utilizado foi testado, previamente, no laboratório quanto à capacidade de desenvolvimento embrionário e, durante todo o experimento, foi utilizada a mesma partida, do mesmo touro. As palhetas de sêmen foram descongeladas a 36,5°C por 30 segundos. O sêmen foi transferido para um gradiente Percoll 45/90 e centrifugado a 3600 g por 7 minutos. Após a remoção do sobrenadante, o pellet foi ressuspensão em 700 µl de meio TCM199 tampão HEPES e centrifugado a 520 g por 5 minutos. Após a remoção do sobrenadante, o pellet foi coletado (50 µl) e ressuspensão em 70 µL de meio FIV (TALP-FIV com 0,6% de BSA). A fertilização *in vitro* foi realizada em gotas de 100 µl de meio Fert-TALP suplementado com 2×10^6 espermatozoides por cerca de 20 horas em atmosfera umedecida de 5% de CO₂ e 38,8°C no ar. Os

presumíveis zigotos, resultantes da fertilização, foram parcialmente desnudados e cultivados em meio SOF suplementado com 1,5% de soro fetal bovino, forskolina (10 μ M) e L-carnitina (1mM), seguindo um protocolo previamente definido (Lima, M.R., 2015). O cultivo foi realizado em estufa incubadora a 38,5°C, 5% de O₂, 5% de CO₂, e umidade de 95%. O feeding foi realizado no D3. A classificação morfológica dos embriões foi realizada utilizando estereomicroscópio (Olympus, SZ40, Washington, EUA), segundo Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embrião (IETS). Os blastocistos grau 1, foram selecionados no D7, para a vitrificação.

3.3.4 Vitrificação e descongelamento dos embriões

No D7, blastocistos e blastocistos expandidos foram selecionados e transferidos, do meio de cultivo para solução de lavagem (TCM 199 suplementado com HEPES, 10% de SFB, 16 μ g/mL de piruvato de sódio, 10.000 UI de penicilina e 10 mg de estreptomicina/mL). Em seguida, os embriões foram vitrificados em grupos de 3 a 5, em dois passos, conforme o protocolo de Vajta *et al.* (1998), com pequenas modificações. Inicialmente, os embriões foram transferidos para a solução de equilíbrio (solução base suplementada com 10% de SFB, 7.5% de etilenoglicol e 7.5% de DMSO) por 3 minutos. Em seguida, foram transferidos para a solução de vitrificação (solução base suplementada com 10% SFB, 16% de etilenoglicol, 16% de DMSO e 0.5M de sacarose). Rapidamente, uma gota mínima (0,1-0,5 μ l) contendo os embriões foi colocada em um dispositivo de vitrificação (WTA, Cravinhos, Brasil) e imersa diretamente em nitrogênio líquido em até 30 segundos. Para o aquecimento a ponta do dispositivo de vitrificação foi rapidamente colocada em solução de lavagem (TCM 199 acrescido de HEPES, 10% de SFB, 16 μ g/mL de piruvato de sódio, 10.000 UI de penicilina e 10 mg de estreptomicina/mL), suplementada com sacarose a 0,3 M, durante 3 minutos. Após esse tempo, os embriões foram transferidos para outra solução de lavagem, agora suplementada com sacarose a 0,15 M, por mais 3 minutos. Em seguida, os embriões foram lavados três vezes em tampão fosfato salino (PBS), suplementado com 1% de soro fetal bovino e depois, transferidos em grupos de 7 a 10 para gotas de 50 μ l de meio SOF, cobertas com óleo mineral. Os embriões foram

cultivados a 38,5°C, 5% de CO₂, em ar atmosférico e máxima umidade. A reexpansão e a eclosão foram avaliadas 2, 24 e 48 horas após o descongelamento.

3.3.5 Detecção de atividade mitocondrial e níveis de espécies reativas de oxigênio

Os níveis de ERO e atividade mitocondrial nos blastocistos foram determinados usando as sondas fluorogênicas CellROX Green (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) e Mitotracker Red CMX Ros (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante. Os blastocistos, de cada grupo, foram corados, simultaneamente, nas próprias gotas de cultivo, protegidos da luz, com 10µg/mL Hoechst 33342 (1:100) CellROX Green (1:100) e 1 mM de Mitotracker Red (1:100). Em seguida, foram incubados a 38,5°, por 1 hora. Após esse tempo, os embriões foram lavados em solução de PBS/BSA e fixados em paraformaldeído 4% (em PBS). Logo após, foram montados em lâminas, cobertos por lamínulas e examinados em microscópio invertido EVOS M5000. As intensidades de fluorescência (média de pixels) e número total de células foram obtidos através do software ImageJ v.1.53 (National Institutes of Health, Maryland, EUA). Os níveis de ERO e a viabilidade mitocondrial foram calculados pela razão entre a intensidade de fluorescência (média de pixels) das sondas e o número total de células nos blastocistos, retirando o background, após seleção manual da área de cada embrião. As intensidades de fluorescência dos embriões corados com Mitotracker Red CMX Ros e CellROX Green foram diretamente proporcionais à atividade mitocondrial e produção de ERO, respectivamente.

3.3.6 Análise estatística

As proporções de embriões clivados, blastocistos produzidos e criosobrevivência (expansão e eclosão) foram avaliadas pelo teste Qui-Quadrado (χ^2). Dados relativos à quantificação lipídica, produção de ERO e atividade mitocondrial nos embriões dos diferentes grupos foram avaliados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os resultados referentes ao número total de células (blastômeros) foram submetidos à análise de variância (ANOVA one-way) e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism, versão 9.4.1, ao nível de significância de 5%.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Efeitos dos reguladores metabólicos e NPZNOs na sobrevivência embrionária após a vitrificação

Após o aquecimento dos embriões, foram avaliadas as taxas de expansão e eclosão, após 2h, 24h e 48h de cultivo, para cada um dos grupos experimentais: controle, L-carnitina 2.5mM, forskolina 10 μ M e NPZNOs 1,0 μ g/mL.

Não foram observadas diferenças nas taxas de re-expansão entre os grupos ($p>0,05$) após 2h, 24h e 48h (tabela 5).

Em relação às taxas de eclosão, os grupos L-carnitina 2,5mM e forskolina 10 μ M apresentaram menores taxas ($p<0,05$) do que o grupo controle, após 24h de cultivo, enquanto o grupo NPZNOs 1,0 μ g/mL não diferiu de nenhum grupo (tabela 6). Após 48h, as taxas de eclosão foram semelhantes entre todos os grupos ($p>0,05$).

Tabela 5: Re-expansão entre os grupos de blastocistos tratados com L-carnitina 2.5mM, forskolina 10 μ M e NPZNOs 1,0 μ g/mL na MIV, após vitrificação, aquecimento e cultivo por 2,24 e 48h

Grupos	Reexpansão n (%) após 2h	Reexpansão n (%) após 24h	Reexpansão n (%) após 48h
Controle	38/48 (79,17)	46/48 (95,83)	42/48 (87,5)
L-carnitina 2,5mM	40/48 (83,3)	43/48 (89,58)	45/48 (93,75)
Forskolina 10μM	16/30 (53,33)	27/30 (90,00)	25/30 (83,33)
NPZNOs 1,0μg/mL	37/46 (80,43)	43/46 (93,48)	42/46 (91,30)

Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,05$ - Qui-Quadrado). A taxa de blastocistos re-expandidos refere-se ao número total de blastocistos reaquecidos após o descongelamento (7 replicatas).

Tabela 6: Eclosão entre os grupos de blastocistos tratados com L-carnitina 2.5mM, forskolina 10 μ M e NPZNOs 1,0 μ g/mL na MIV, após vitrificação, aquecimento e cultivo por 24 e 48h

Grupos	Eclosão n (%) após 24h	Eclosão n (%) após 48h
Controle	20/48 (41,7) ^a	23/48 (47,92)
L-carnitina 2,5mM	9/48 (18,8) ^b	16/48 (33,33)
Forscolina 10 μ M	5/30 (16,7) ^b	13/30 (43,33)
NPZNOs 1,0 μ g/mL	17/46 (37) ^{ab}	20/46 (43,48)

a,b sobrescrito na mesma coluna, indica diferença estatística ($p < 0,05$ - Qui-Quadrado). A taxa de blastocistos eclodidos refere-se ao número total de blastocistos reaquecidos após o descongelamento (7 replicatas).

3.4.2 Efeitos dos reguladores metabólicos e NPZNOs na atividade mitocondrial de embriões bovinos após o descongelamento e cultivo por 48h

A avaliação da atividade mitocondrial foi realizada nos blastocistos bovinos, com a sonda Mitotracker Red CMX Ros (figura 24).

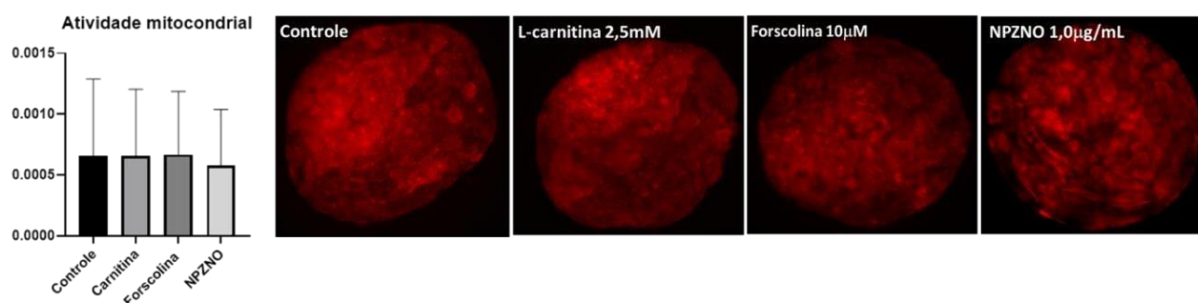


Figura 24: Atividade mitocondrial em embriões bovinos vitrificados, após 48h de reaquecimento. O gráfico e as imagens mostram as intensidades de fluorescência da sonda Mitotracker Red CMX ROS, após exposição dos embriões bovinos aos diferentes tratamentos. O software ImageJ foi utilizado para quantificar as estruturas, a partir da intensidade de fluorescência após a conversão da imagem para 8 bits e a delimitação do citoplasma. As imagens foram capturadas na objetiva de 20x.

Não foi detectada diferença significativa na intensidade de fluorescência da sonda MitoTracker Red CMX ROS entre os grupos ($p > 0,05$), o que significa dizer que

não houve interferência na atividade mitocondrial embrionária quando os reguladores metabólicos e as NPZNOs foram adicionados na MIV.

3.4.3 Efeitos dos reguladores metabólicos e NPZNOs nos níveis de ERO em embriões bovinos após o descongelamento e cultivo por 48h

A produção de ERO foi avaliada nos blastocistos bovinos com a sonda CellRox Green, nos blastocistos (figura 25).

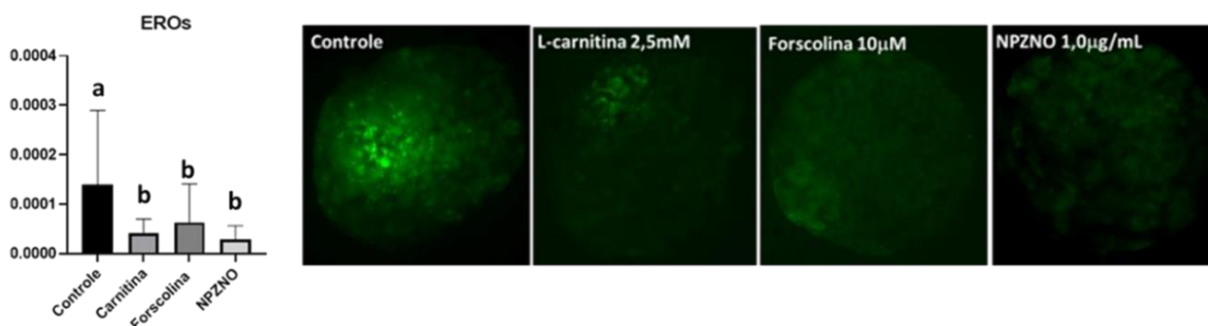


Figura 25: Imagens representativas de blastocistos bovinos corados para níveis intracelulares de ERO (espécies reativas de oxigênio). O gráfico e as imagens mostram as intensidades de fluorescência de blastocistos bovinos vitrificados, corados com a sonda CellRox Green, após 48h de reaquecimento. Letras diferentes no gráfico indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Foram detectadas diferenças significativas na intensidade de fluorescência da sonda Cell Rox Green entre os tratamentos e grupo controle ($p < 0,05$), o que significa dizer que os tratamentos propostos contribuem para uma menor produção de espécies reativas de oxigênio, quando adicionadas na MIV.

Na figura 26 são demonstrados embriões bovinos, após 48h de reaquecimento, corados, simultaneamente, para avaliação da atividade mitocondrial e produção de ERO. Os resultados demonstram as intensidades de fluorescência da sonda Mitotracker Red CMX Ros e CellRox Green normalizadas pelo número total de células do embrião, em relação aos diferentes tratamentos.

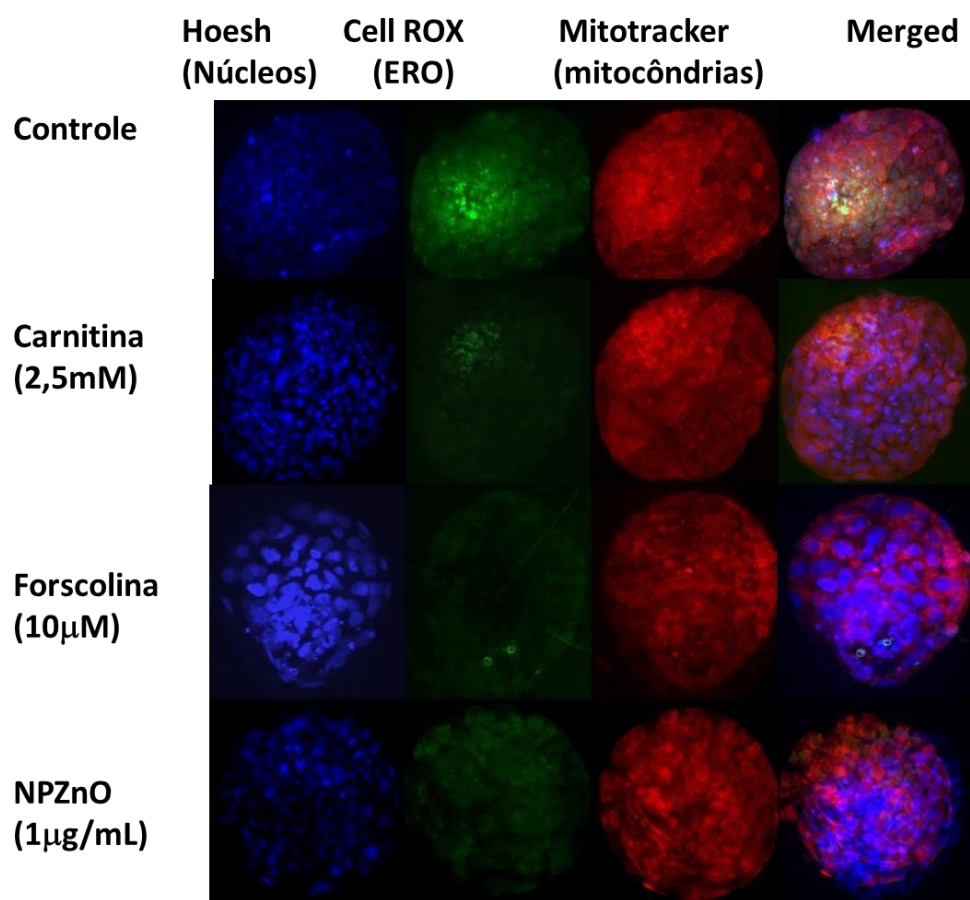


Figura 26: Imagens de embriões bovinos 48h após o reaquecimento, demonstrando a atividade mitocondrial (Mitotracker Red CMX Ros) e a produção de radicais livres (Cell Rox Green) nos diferentes tratamentos adicionados na MIV.

3.5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, houve um aumento significativo no número de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV), totalizando, aproximadamente, um milhão de embriões em 2019. A fim de gerenciar esses números elevados de embriões, a criopreservação é uma ferramenta essencial, uma vez que o setor produtivo pode programar a transferência embrionária de acordo com o ciclo reprodutivo da receptora, bem como realizar transferências a longas distâncias. Contudo, apesar desses aspectos positivos advindos com o uso da técnica, as taxas de criosobrevivência de embriões PIV ainda são baixas quando comparadas com embriões derivados *in vivo* (Moore e Hasler, 2017; Ferré *et al.*, 2020b) e a falta de homogeneidade dos resultados entre os diferentes laboratórios ainda prejudica a disseminação maciça dessa biotecnologia a campo (Marsico *et al.*, 2019).

A vitrificação é uma técnica amplamente adotada devido à sua rapidez e baixo custo. No entanto, o sucesso dessa técnica está ligado à capacidade de desenvolvimento embrionário, que, por sua vez, depende da competência morfofuncional, celular e molecular do embrião. De acordo com Marsico *et al.* (2019), a qualidade de um embrião é determinada por marcadores moleculares favoráveis, como níveis de transcritos, proteínas, metabólitos e conteúdo de lipídios de membrana.

Embora o termo "qualidade" seja abrangente e os critérios para classificar os embriões não estejam totalmente estabelecidos, diversos estudos avaliam a qualidade embrionária considerando aspectos específicos, como taxa de apoptose, presença de ERO, acúmulo lipídico, resistência ao congelamento e taxa de gestação (Pereira *et al.*, 2008; Paschoal *et al.*, 2012; Sanches *et al.*, 2013; Accorsi *et al.*; 2016).

De acordo com Seidel *et al.* (2006), um dos motivos para a redução na criotolerância de embriões PIV é a peroxidação lipídica. Esse processo ocorre quando os embriões são submetidos a condições de estresse oxidativo, como aquelas experimentadas durante o processo de criopreservação (congelamento e descongelamento). Isso ocorre devido à interação entre as espécies reativas de oxigênio, presentes no ambiente *in vitro*, com os lipídios de membrana embrionários. Esse processo resulta na formação de produtos tóxicos, que podem causar danos à

integridade estrutural e funcional das membranas celulares (Sudano *et al.*, 2010), proteínas e até mesmo no material genético.

Alterações na fluidez da membrana plasmática têm um impacto significativo nos resultados dos protocolos de criopreservação, contribuindo para a redução da viabilidade e do desenvolvimento embrionário (Lanzarini *et al.*, 2021).

Assim, nas biotecnologias reprodutivas, a lipoperoxidação é considerada uma das principais causas da baixa fertilidade dos espermatozoides submetidos ao processo de criopreservação e um desafio ao desenvolvimento embrionário *in vitro* (Nasr-Esfahani, 1990; Chatterjee *et al.*, 2001). Além disso, em comparação com humanos e camundongos, os ruminantes têm acúmulo maior de gotículas lipídicas embrionárias, o que torna seu citoplasma escuro (Van Soom *et al.*, 2003) e os embriões menos tolerantes ao congelamento (Rizos *et al.*, 2008; Sudano *et al.*, 2011; Marsico *et al.*, 2019).

Assim, devido ao exposto, nosso objetivo nesse segundo estudo foi avaliar o efeito dos tratamentos mais eficazes, identificados a partir dos resultados do experimento, em relação às taxas de criosobrevivência e aos parâmetros de qualidade, como atividade mitocondrial e produção de ERO, de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Baseados em estudos prévios (Del Collado *et al.* 2017), que sugerem que a MIV pode afetar a atividade mitocondrial e as vias de β -oxidação e glicólise, optamos por testar os reguladores metabólicos nessa etapa da PIVE. Assim, foram adicionados a L-carnitina 2,5mM, forskolina 10 μ M e NPZNOs 1 μ g/mL na MIV. Os embriões resultantes desses processos foram vitrificados, reaquecidos e avaliados após 48h.

Não foram observadas diferenças nas taxas de expansão e eclosão após a suplementação dos reguladores metabólicos e NPZNOs na MIV, 48 h após o descongelamento, apesar de ambos os tratamentos, L-carnitina 2,5mM e forskolina 10 μ M terem contribuído para a redução do acúmulo lipídico.

Resultados semelhantes foram encontrados por Paschoal e colaboradores (2017), que também não detectaram diferenças nas taxas de criopreservação quando suplementaram o meio CIV no D6 com 10 μ M de forskolina. Esses resultados, entretanto, vão ao encontro dos achados de Panyaboriban *et al* (2018), que observaram melhores taxas de criosobrevivência quando a forskolina (10 μ M) foi adicionada entre D2 e D7, apesar dos últimos autores terem utilizado outro método de congelamento, que foi o método tradicional de congelamento lento. Cuello *et al.* (2013)

também observaram uma associação entre redução do acúmulo lipídico com 10 μ M de forskolina e melhores taxas de desenvolvimento de embriões suínos, após o descongelamento. No entanto, conforme já afirmado anteriormente, cabe ressaltar que o efeito da forskolina, através do aumento do AMPc, pode ter efeitos positivos ou negativos no desenvolvimento embrionário, a depender da dose empregada (Raza *et al.*, 2021). Enquanto níveis adequados de AMPc no citoplasma estão relacionados ao aumento da função mitocondrial oocitária (Wu *et al.*, 2020) e à manutenção da integridade do DNA nos oócitos, concentrações muito altas podem resultar em bloqueio meiótico e parada do desenvolvimento (Paschoal *et al.*, 2016).

Em relação à L-carnitina, são encontrados na literatura resultados bastante controversos e de acordo com Carrillo-González *et al* (2020), os efeitos dessa substância podem variar dependendo do estágio específico do desenvolvimento embrionário em que é adicionada ao meio, concentrações e método de congelamento. Os autores testaram os efeitos da L- carnitina isolada na MIV (3,03mM), isolada no CIV (1,5mM) e nas duas etapas, simultaneamente, em relação à redução do acúmulo lipídico e impacto na criosobrevivência. De modo semelhante aos resultados do presente estudo, em nenhuma das situações, foram observadas diferenças nas taxas de criosobrevivência, mesmo quando foi detectado redução do acúmulo lipídico pelo regulador metabólico.

Uma possível explicação para a variação dos resultados encontrados na literatura é a influência genética na resposta embrionária aos reguladores metabólicos e à competência de sobrevivência do embrião à criopreservação (Baldoxeda, *et al.* 2016, Marsico *et al.*, 2019).

Como em nosso estudo foram utilizados ovários de abatedouro local, que tipicamente recebe animais mestiços, não foi possível ter o controle sob o genótipo das fêmeas doadoras de ovário, o que pode ter influenciado na ausência de distinção nas taxas de criosobrevivência. A influência genética foi confirmada no trabalho de Baldoxeda *et al* (2015), que observaram diferenças nos perfis lipídicos e na atividade mitocondrial ao comparar as raças Jersey e Holandesa, sendo esta última raça mais susceptível ao impacto da L-carnitina (0,5mM) no metabolismo embrionário.

Nesse contexto, considerando que existem evidências de que, pelo menos quatro classes de lipídios afetam a criosobrevivência, triglicerídeos, ácidos graxos livres, colesterol e os fosfolipídios (Ghanem *et al.*, 2014), podemos sugerir que não somente o acúmulo lipídico irá influenciar nos resultados de desenvolvimento

embrionário após a vitrificação, como também o perfil, ou seja, a composição e proporção de determinados lipídios embrionários. Assim, apesar de já existirem biomarcadores positivos para a criosobrevivência descritos na literatura, (Sudano *et al.*, 2012), sabemos que a proporção de ácidos graxos no embrião também vai depender de outros fatores, como componentes do meio, atmosfera de cultivo e presença de SFB. Dessa forma, os perfis lipídicos embrionários podem ser alterados de acordo com as condições experimentais. Além disso, essa área apresenta amplo horizonte de estudo, visto que, o completo entendimento da importância biológica de cada tipo de lipídio no desenvolvimento embrionário permanece, em grande parte, desconhecido (Del Collado *et al.*, 2017).

Em nossas condições experimentais, análises dos embriões reaquecidos (após 48h), submetidos à forscolina e à L-carnitina na MIV, demonstraram que os reguladores metabólicos não promovem alteração na atividade mitocondrial, e ao mesmo tempo, contribuem para a redução dos radicais livres, cujos efeitos prejudiciais no desenvolvimento embrionário, *in vitro*, são amplamente descritos (Mishra *et al.*, 2016; Sovernigo *et al.*, 2017; Deluao *et al.*, 2022; Agarwal, *et al.*, 2022; Marsico *et al.*, 2023). Com base nesses resultados, as perspectivas futuras desse estudo consistem na análise do perfil lipídico embrionário, que contribuirá para ampliar nosso entendimento sobre os dados obtidos e na transferência dos embriões tratados para receptoras, após o reaquecimento, a fim de verificarmos os efeitos dos tratamentos propostos nas taxas de prenhez.

Ainda, no presente trabalho demonstramos, pela primeira vez, os efeitos das NPZNOs sobre a atividade mitocondrial e produção de ERO, em embriões bovinos, após a vitrificação. Nossa pesquisa contribui significativamente para ampliar o conhecimento sobre esses nanomateriais, que têm despertado grande interesse da comunidade científica (Saleemi *et al.*, 2022; Farhadi *et al.*, 2022; Khalique *et al.*, 2023; Kandil *et al.*, 2023).

Apesar de existirem relatos envolvendo estudos sobre os efeitos biológicos das NPZNOs, na área de reprodução animal, a maioria dos estudos retrata os seus efeitos na criopreservação do sêmen (Isaac *et al.*, 2017; Farhadi *et al.*, 2022; Abedin, *et al.*, 2023; Khalique *et al.*, 2023).

Um desses estudos (Isaac *et al.*, 2017) investigou os efeitos da adição de NPZNOs ao meio de criopreservação na redução dos danos causados pelo processo de congelamento e descongelamento em espermatozoides. Como resultados, os

autores comprovaram maior integridade do DNA e menor nível de MDA, marcador de peroxidação lipídica, no grupo tratado com as NPZNOs. Análises de microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução demonstraram que as NPZNOs não penetram na membrana dos espermatozoides, mas permanecem ao redor deles, promovendo estabilização da membrana celular, impedindo a entrada de moléculas pró-oxidantes e reduzindo a suscetibilidade das membranas à peroxidação lipídica. Segundo os autores, é provável que a proteção das NPZNOs contra a lipoperoxidação contribua para mitigar o subsequente efeito prejudicial sobre macromoléculas, como o DNA, e organelas cruciais, como as mitocôndrias.

De modo semelhante, Picco *et al* (2010) afirmam que o zinco é um co-fator essencial de enzimas importantes no desenvolvimento embrionário inicial e sua deficiência pode levar ao estresse oxidativo.

O primeiro e um dos poucos estudos sobre os efeitos das NPZNOs na criosobrevivência de embriões bovinos foi o trabalho de Abdel-Halim e Helmy em 2017. Os autores constataram um efeito crioprotetor quando as NPs foram adicionadas na MIV e no meio de vitrificação na concentração de 1µg/mL. O mesmo não foi observado em nosso estudo, em que as NPs foram adicionadas somente na MIV. No entanto, encontramos efeitos semelhantes em relação ao potencial antioxidante desses nanomateriais.

Dawei *et al* (2009), também comprovaram o efeito antioxidante das NPZNOs através da redução do conteúdo de MDA, um marcador de peroxidação lipídica e do aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em todos os grupos tratados com as NPZNOs.

Estudos anteriores (Afifi *et al.*, 2015), também demonstraram que a ingestão de NPZNOs por ratos diabéticos, promove aumento das enzimas antioxidantes, CAT e SOD testiculares, e contribui para redução dos níveis de MDA. Em bovinos, a adição de zinco na MIV reduziu a apoptose nas células do cúmulus e aumentou a atividade da SOD (Anchordoquy *et al.*, 2014).

No presente estudo, constatamos que a adição de NPZNOs adicionadas na MIV na concentração de 1µg/mL, não promoveu diferenças significativas nas taxas de expansão e de eclosão de embriões bovinos e também não interferiu na atividade mitocondrial. No entanto, demonstramos pela primeira vez a ação antioxidante de NPZNOs em blastocistos bovinos reaquecidos após a vitrificação. Essa descoberta se

faz importante porque, embora quantidades adequadas de ERO sejam importantes para a função celular, sua geração excessiva durante a criopreservação, pode resultar em peroxidação lipídica, danos ao DNA, oxidação de proteínas e comprometimento do desenvolvimento embrionário (Olexiková *et al.*, 2022). Sabe-se que durante o processo de vitrificação e descongelamento, os gametas e embriões enfrentam injúrias celulares que, muitas vezes, aumentam a produção de ERO e resultam em estresse oxidativo (Tatone *et al.*, 2010; Mateo-Otero *et al.*, 2021).

Um trabalho recente (Olexiková *et al.*, 2022) demonstrou os efeitos da adição de glutathiona, um antioxidante eficaz, no meio de reaquecimento de oócitos vitrificados. Após o descongelamento, os oócitos foram fertilizados e as análises realizadas nos blastocistos produzidos *in vitro*. O estudo demonstrou que a adição do antioxidante no meio de descongelamento de oócitos vitrificados, anteriormente à FIV, contribuiu para reduzir as taxas de apoptose, aumentou a proporção de blastocistos em estágios mais avançados no D7 e reduziu o dano causado pelo processo de vitrificação em filamentos de actina do citoesqueleto dos blastocistos produzidos.

Assim, devido a associação existente entre acúmulo lipídico, estresse oxidativo, lipoperoxidação versus redução na criosobrevivência e qualidade embrionária, nosso estudo focou em propor estratégias de regulação metabólica e antioxidante, visando efeitos em embriões bovinos criopreservados, pois, apesar do desenvolvimento pré-implantacional de embriões de mamíferos seguir um padrão metabólico, já amplamente descrito na literatura, ainda não há consenso sobre como utilizar os biomarcadores metabólicos para prever a viabilidade dos embriões. Por outro lado, a nanotecnologia surge como um campo emergente da biotecnologia com potenciais aplicações biomédicas e as NPZNOs com um papel promissor, principalmente, devido às suas propriedades antioxidantes. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para o desenvolvimento de novas abordagens em relação à utilização dessas substâncias, visando ao incremento dos resultados associados às biotecnologias reprodutivas.

3.6 CONCLUSÃO

Os resultados de criosobrevivência e atividade mitocondrial mostraram que as substâncias testadas não interferiram nas taxas de expansão e eclosão, e no número de mitocôndrias ativas, nos embriões bovinos vitrificados e reaquecidos, após 48h. Adicionalmente, todas as substâncias reduziram a produção de ERO nos embriões analisados após o reaquecimento, sendo este um achado importante pois o estresse oxidativo representa uma das principais causas prejudiciais ao desenvolvimento embrionário *in vitro* e à criosobrevivência. Estudos adicionais são necessários para avaliar a suplementação dessas substâncias em outros estágios da PIVE, bem como a avaliação da taxa de prenhez de embriões submetidos aos tratamentos propostos e criopreservados.

3.7 REFERÊNCIAS

ABDEL-HALIM, B. R.; HELMY, N. A. Effect of nano-selenium and nano-zinc particles during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes.

Animal Production Science, v. 58, n. 11, p. 2021-2028, 2017.

ABE, H. et al. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Molecular Reproduction and Development*, v. 61, p. 57-66, 2002.

ABE, H. et al. Respiration activity of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing media. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 17, n. 2, p. 215, 2004.

ABEDIN, S. N. et al. In vitro and in vivo studies on the efficacy of zinc-oxide and selenium nanoparticle in cryopreserved goat (*Capra hircus*) spermatozoa. *Biological Trace Element Research*, 2023, p. 1-20.

ACCORSI, M. F. et al. Reduction in cytoplasmic lipid content in bovine embryos cultured in vitro with linoleic acid in semi-defined medium is correlated with increases in cryotolerance. *Zygote*, v. 24, n. 4, p. 485-494, 2016.

AGARWAL, A. et al. Oxidative stress and assisted reproduction: A comprehensive review of its pathophysiological role and strategies for optimizing embryo culture environment. *Antioxidants*, v. 11, n. 3, p. 477, 2022.

AFIFI, M. et al. Ameliorative Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on Antioxidants and Sperm Characteristics in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Testes. *Biomed Res Int*, 2015, 153573.

ANCHORDOQUY, J. M. et al. The importance of having zinc during in vitro maturation of cattle cumulus–oocyte complex: role of cumulus cells. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 49, n. 5, p. 865-874, 2014.

BALDOCEDA, L. et al. Genetic influence on the reduction in bovine embryo lipid content by L-carnitine. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 28, n. 8, p. 1172-1184, 2016.

CARRILLO-GONZÁLEZ, D. F. et al. L-carnitine supplementation during in vitro maturation and in vitro culture does not affect the survival rates after vitrification and warming but alters Inf-T and ptgs2 gene expression. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 16, p. 5601, 2020.

CARRILLO-GONZÁLEZ, D. F.; HERNÁNDEZ-HERRERA, D. Y.; MALDONADO-ESTRADA, J. G. The role of L-carnitine in bovine embryo metabolism. A review of the effect of supplementation with a metabolic modulator on in vitro embryo production. *Animal Biotechnology*, v. 34, n. 2, p. 413-423, 2023.

CHATTERJEE, S. et al. GPI anchoring leads to sphingolipid-dependent retention of endocytosed proteins in the recycling endosomal compartment. *The EMBO Journal*, v. 20, n. 7, p. 1583-1592, 2001.

CHOI, H. W.; JANG, H. Application of Nanoparticles and Melatonin for Cryopreservation of Gametes and Embryos. *Current Issues in Molecular Biology*, v. 44, n. 9, p. 4028-4044, 2022.

COLAGAR, A. H.; MARZONY, E. T.; CHAICHI, M. J. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutrition Research*, v. 29, n. 2, p. 82-88, 2009.

COSTA, C. B. et al. Influence of forskolin supplementation on embryos produced in vitro. *Livestock Science*, v. 221, p. 15-18, 2019.

CUELLO, C. et al. Effect of MEM vitamins and forskolin on embryo development and vitrification tolerance of in vitro-produced pig embryos. *Animal Reproduction Science*, v. 136, n. 4, p. 296-302, 2013.

DALCIN, L.; LUCCI, C. M. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, p. 149-159, 2010.

DAWEI, A.; ZHISHENG, W.; ANGUO, Z. Protective effects of nano-ZnO on the primary culture mice intestinal epithelial cells in in vitro against oxidative injury. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 8, p. 1964–1967, 2009.

DE ANDRADE MELO-STERZA, F.; POEHLAND, R. Lipid Metabolism in Bovine Oocytes and Early Embryos under In Vivo, In Vitro, and Stress Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 7, p. 3421, 2021.

DE SOUSA, R. V. et al. Biopsy of bovine embryos produced in vivo and in vitro does not affect pregnancy rates. *Theriogenology*, v. 90, p. 25–31, 2017.

DEL COLLADO, M. et al. In vitro maturation impacts cumulus–oocyte complex metabolism and stress in cattle. *Reproduction*, v. 154, n. 6, p. 881-893, 2017.

DELUAO, J. C. et al. OXIDATIVE STRESS AND REPRODUCTIVE FUNCTION: Reactive oxygen species in the mammalian pre-implantation embryo. *Reproduction*, v. 164, n. 6, p. F95-F108, 2022.

FADL, A. et al. Nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas ecologicamente corretas melhoraram a qualidade do sêmen congelado e descongelado e a capacidade antioxidante de carneiros. *Jornal de Pesquisa Veterinária Avançada*, v. 12, n. 3, p. 259-264, 2022.

FARHADI, F. et al. Zinc Oxide Nanoparticles Have Beneficial Effect on Frozen-Thawed Spermatozoa of Holstein Bulls. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, v. 12, n. 1, p. 49-55, 2022.

FERRÉ, L. B. et al. Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: Impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 55, n. 6, p. 659-676, 2020.

GHANEM, N. et al. Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced in vitro and cultured with chemicals modulating lipid metabolism. *Theriogenology*, [S.l.], v. [ano], n. [número], p. 54-66, 2022.

GHANEM, N.; FAKRUZZAMAN, M.; BATAWI, A. H.; KONG, I. K. Post-thaw viability, developmental and molecular deviations in in vitro produced bovine embryos cultured with l-carnitine at different levels of fetal calf serum. *Theriogenology*, v. 191, p. 54-66, 2022.

HASHEM, N. M.; GONZALEZ-BULNES, A. State-of-the-art and prospective of nanotechnologies for smart reproductive management of farm animals. *Animals*, v. 10, n. 5, p. 840, 2020.

HEIDARI, J. et al. Efeito do óxido de nano zinco sobre variáveis pós-descongelamento e estado oxidativo do sêmen de carneiro Moghani. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, v. 25, n. 1, [páginas], 2018.

HELD-HOELKER, E. et al. Cryosurvival of in vitro produced bovine embryos supplemented with l-Carnitine and concurrent reduction of fatty acids. *Theriogenology*, v. 96, p. 145-152, 2017.

ISAAC, A. V. et al. Supplementing zinc oxide nanoparticles to cryopreservation medium minimizes the freeze-thaw-induced damage to spermatozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 494, n. 3-4, p. 656-662, 2017.

JAHANBIN, R. et al. In vivo and in vitro evaluation of bull semen processed with zinc (Zn) nanoparticles. *Biological Trace Element Research*, v. 199, p. 126-135, 2021.

JANATI IDRISSE, S. et al. Lipid profile of bovine grade-1 blastocysts produced either in vivo or in vitro before and after slow freezing process. *Scientific Reports*, v. 11, p. 11618, 2021.

KHALIQUE, M. A. et al. Antioxidant effects of zinc-oxide nanoparticles on post-thaw quality and in vivo fertility of Beetal buck spermatozoa. *Small Ruminant Research*, v. 225, p. 107012, 2023.

KANDIL, O. M. et al. Effect of Zinc and Nano Zinc on Developmental Competence of Buffalo Oocytes. *Journal of Advanced Veterinary Research*, v. 13, n. 3, p. 474-478, 2023.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biology of Reproduction*, v. 62, n. 4, p. 847-856, 2000.

KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*, v. 82, n. E-Suppl, p. E14-E23, 2004.

KUMAR, R.; KUMAR, M.; LUTHRA, G. Fundamental approaches and applications of nanotechnology: A mini review. *Materials Today: Proceedings*, 2023.

LANZARINI, F. et al. ELOVL5 participates in embryonic lipid determination of cellular membranes and cytoplasmic droplets. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 3, p. 1311, 2021.

LONERGAN, P. et al. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reproduction Nutrition Development*, v. 41, n. 5, p. 427-437, 2001.

MARSICO, T. V. et al. Embryo competence and cryosurvival: Molecular and cellular features. *Animal Reproduction*, v. 16, p. 423-439, 2019.

MARSICO, T. V. et al. Unraveling the Consequences of Oxygen Imbalance on Early Embryo Development: Exploring Mitigation Strategies. *Animals*, v. 13, n. 13, p. 2171, 2023.

MATEO-OTERO, Y. et al. Cryopreservation and oxidative stress in porcine oocytes. *Research in Veterinary Science*, v. 135, p. 20–26, 2021.

MENEGHEL, M. et al. Lipid content and cryotolerance of in vitro-produced bovine embryos treated with forskolin before vitrification. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 37, p. 395-400, 2017.

MISHRA, A. et al. L-carnitine mediated reduction in oxidative stress and alteration in transcript level of antioxidant enzymes in sheep embryos produced in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 51, p. 311, 2016.

MOORE, S. G.; HASLER, J. F. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 12, p. 10314-10331, 2017.

NASR-ESFAHANI, M. H. et al. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo. *Development*, v. 109, n. 2, p. 501-507, 1990.

OLEXIKOVÁ, L. et al. Glutathione during Post-Thaw Recovery Culture Can Mitigate Deleterious Impact of Vitrification on Bovine Oocytes. *Antioxidants*, v. 12, n. 1, p. 35, 2022.

OLIVEIRA, C. S. et al. Modulation of lipid metabolism through multiple pathways during oocyte maturation and embryo culture in bovine. *Zygote*, v. 30, n. 2, p. 258-266, 2022.

OMIETIMI, H. B. et al. Uma visão geral da nanotecnologia e sua aplicação. In: *E3S Web of Conferences*, v. 391, p. 01079, 2023.

PANYABORIBAN, S. et al. Treatment with chemical delipidation forskolin prior to cryopreservation improves the survival rates of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) and bovine (*Bos indicus*) in vitro produced embryos. *Cryobiology*, 2018. ISSN 0011-2240.

PASCHOAL, D. M. et al. Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. *Zygote*, v. 22, p. 146–157, 2012.

PASCHOAL, D. M. et al. In vitro embryos production after oocytes treatment with forskolin. *Zygote*, v. 24, n. 2, p. 161-171, 2016.

PASCHOAL, D. M. et al. Cell apoptosis and lipid content of in vitro–produced, vitrified bovine embryos treated with forskolin. *Theriogenology*, v. 87, p. 108-114, 2017.

PEREIRA, R. M.; MARQUES, C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell and Tissue Banking*, v. 9, n. 4, p. 267– 277, 2008.

PICCO, S. J. et al. Effect of increasing zinc sulphate concentration during in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 74, n. 7, p. 1141-1148, 2010.

PODOLAK, A., WOCLAWEK-POTOCKA, I., LUKASZUK, K. The Role of Mitochondria in Human Fertility and Early Embryo Development: What Can We Learn for Clinical Application of Assessing and Improving Mitochondrial DNA? *Cells*, 2022.

PRATES, E. G. et al. Fat area and lipid droplets morphology of porcine oocytes during in vitro maturation with trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (t10, c12 CLA) and forskolin. *Animal*, v. 7, n. 4, p. 602–609, 2012.

RAZA, S. H. A. et al. The role of forskolin as a lipolytic stimulator during in vitro oocyte maturation and the in vitro embryo production of livestock. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 56, n. 12, p. 1486-1496, 2021.

RIZOS, D. et al. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction*, v. 68, p. 236-243, 2003.

RIZOS, D. et al. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p. 44-50, 2008.

SALEEMI, M. A. et al. Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles with Bioflavonoid Rutin: Characterisation, Antioxidant and Antimicrobial Activities and In Vivo Cytotoxic Effects on *Artemia Nauplii*. *Antioxidants*, v. 11, p. 1853, 2022.

SANCHES, B. V. et al. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology*, v. 80, p. 372-377, 2013.

SANCHES, B. V. et al. Cryopreservation of in vitro-produced embryos: challenges for commercial implementation. *Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE); Cabo de Santo Agostinho, PE, Brazil, August 17th to 19th, 2017.*

SEIDEL Jr., G. E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*, v. 65, n. 1, p. 228– 235, 2006.

SHAHIN, M. A. et al. Comparison between the effects of adding vitamins, trace elements, and nanoparticles to shotor extender on the cryopreservation of dromedary camel epididymal spermatozoa. *Animals*, v. 10, n. 1, p. 78, 2020.

SOLTANI, L.; GHANEIALVAR, H.; MAHDAVI, A. H. An overview of the role of metallic and nonmetallic nanoparticles and their salts during sperm cryopreservation and in vitro embryo manipulation. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, v. 42, n. 3, p. 262-279, 2023.

SOVERNIGO, T. C. et al. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 52, n. 4, p. 561-569, 2017.

SUDANO, M. J. et al. Relação entre o metabolismo energético do embrião e o acúmulo de lipídios, p. 246, 2010.

SUDANO MJ, PASCHOAL DM, DA SILVA RASCADO T, MAGALHÃES LCO, CROCOMO LF, DE LIMA-NETO JF, DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA F. 2011. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*, 75:1211-1220.

SUDANO, M. J. et al. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *bos taurus indicus* and *bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. *Biol. Reprod.*, v. 87, n. 130, p. 1-11, 2012.

SUDANO, M. J. et al. Lipidome signatures in early bovine embryo development. *Theriogenology*, v. 86, p. 472-484, 2016.

TATONE, C.; DI EMIDIO, G.; VENTO, M.; CIRIMINNA, R.; ARTINI, P.G. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. *Gynecol. Endocrinol.*, 26, p. 563–567, 2010.

VALENTE, R. S.; MARSICO, T. V.; SUDANO, M. J. Basic and applied features in the cryopreservation progress of bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, v. 239, 106970, 2022.

VAN SOOM A, MATEUSEN B, LEROY J, DE KRUIF A. Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? *Reprod Biomed Online*, 7, p. 664-670, 2003.

VIANA J.H.M. 2018. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. In *Embryo Technology Newsletter*, 36(4), p. 8-25. http://www.iets.org/comm_data.asp.

ZHANG, D.; MA, X. L.; GU, Y.; HUANG, H.; ZHANG, G. W. Green synthesis of metallic nanoparticles and their potential applications to treat cancer. *Frontiers in Chemistry*, v. 8, 2020.

ZOLINI, A. M. et al. Effect of addition of L-carnitine to media for oocyte maturation and embryo culture on development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*, v. 133, p. 135-143, 2019.

YAZDANSHENAS, P. et al. Efeito do nanocomplexo de zinco na qualidade do sêmen de touros e no resultado da gestação. *Produção Animal*, 18 (1), 173-181, 2016.

WU, X. C. et al. Combined use of dbcAMP and IBMX minimizes the damage induced by a long-term artificial meiotic arrest in mouse germinal vesicle oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, v. 87, n. 2, p. 262-273, 2020.

3.8 PERSPECTIVAS

- Realização do perfil lipídico dos embriões expostos à melhores estratégias com reguladores metabólicos na MIV;
- Suplementação das NPZNOs no meio de vitrificação, a fim de avaliar a resposta em relação à criosobrevivência;
- Transferência para receptoras de embriões vitrificados e tratados com L-carnitina 2,5mM, forskolina 10 μ M e NPZNOs 1 μ g/mL na MIV, para avaliação do desenvolvimento pós-implantacional.