

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

Yuri Sabbagh Terra

**Efeitos da suplementação de nanopartículas de óxido de zinco sobre o
desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro***

Juiz de Fora

2026

Yuri Sabbagh Terra

Efeitos da suplementação de nanopartículas de óxido de zinco sobre o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr^a. Michele Munk Pereira

Coorientador: Dr^a. Naiara Zoccal Saraiva

Juiz de Fora

2026

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

Terra, Yuri Sabbagh.

Efeitos da suplementação de nanopartículas de óxido de zinco sobre o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos in vitro / Yuri Sabbagh Terra. -- 2026.

77 f. : il.

Orientadora: Michele Munk Pereira

Coorientadora: Naiara Zoccal Saraiva

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2026.

1. Nanotecnologia. 2. Biotecnologia. 3. Estresse oxidativo. 4. Oócitos. 5. Blastocistos. I. Pereira, Michele Munk, orient. II. Saraiva, Naiara Zoccal, coorient. III. Título.

Yuri Sabbagh Terra

Efeitos da suplementação de nanopartículas de óxido de zinco sobre o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos in vitro

Dissertação apresentada ao Programa da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Genética & biotecnologia

Aprovada em 06 de março de 2026.

BANCA EXAMINADORA

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

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr^a. Jasmin O'Brien

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Juiz de Fora, 13/02/2026.



Documento assinado eletronicamente por **Michele Munk Pereira, Professor(a)**, em 06/03/2026, às 14:51, 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 06/03/2026, às 15:11, 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 **JASMIN, Usuário Externo**, em 06/03/2026, às 16:26, 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 **2877167** e o código CRC **4DC8BA7C**.

Dedico este trabalho ao meu avô,
Georges, meu maior exemplo, que sempre
ressaltou a importância dos estudos em
nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da UFJF e seu corpo docente, por todo o aprendizado e oportunidade de realizar o mestrado.

À Embrapa Gado de Leite, por fornecer toda a infraestrutura para realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG processos APQ-01855-23, APQ 02041-22 e RED00081-23) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq processo 305109/2024-3) por todo o suporte financeiro e concessão da bolsa de estudos que permitiram a realização deste projeto.

À minha orientadora, Dr^a. Michele Munk, pela oportunidade e confiança em desenvolver o projeto, por todo o suporte, ensinamentos e conversas.

À Dr^a. Naiara Zoccal Saraiva, por todos os ensinamentos diários nestes últimos anos. Pelo acompanhamento deste trabalho, por apoiar meu desenvolvimento e pelas palavras de incentivo, meu muito obrigado.

À Dr^a. Carolina Capobiango, por ter me recebido, primeiramente, como estagiário no Laboratório de Reprodução Animal e me ensinado e apoiado por toda a trajetória até aqui. Seus ensinamentos e colaboração foram a base desse trabalho, obrigado por tudo.

Ao Dr. Wasim Al Shebli, pela amizade e por compartilhar seus conhecimentos. Obrigado por ter apoiado minha formação e pela parceria dentro e fora do laboratório.

Ao Dr. Humberto de Mello Brandão, por toda sua disposição em colaborar com a execução dos experimentos e dividir sua experiência.

À equipe do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite, especialmente ao Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo e Dr^a. Clara Slade, pelo apoio técnico e científico. Ao Myro e ao Joel, pelo suporte e colaboração essencial nas atividades do laboratório.

A todos os amigos da Embrapa Gado de Leite, pelo apoio constante nos experimentos, pelos ensinamentos e convívio. Aos colegas do Laboratório de Nanotecnologia e Nanotoxicologia da UFJF, por toda colaboração.

À toda minha família, em especial à minha mãe, pelo esforço em me dar as melhores condições de vida e estudo. Seu apoio foi fundamental na minha formação pessoal e profissional.

À minha companheira, Mariana, pelo incentivo constante e por estar ao meu lado em todos os momentos. Obrigado pelo carinho diário, por me dar forças para enfrentar os desafios e pela paciência nos momentos mais difíceis. Sou imensamente grato por caminhar ao seu lado.

À Carmem, ao José Eduardo e ao Eduardo, por todo o carinho, incentivo, apoio e conversas. Vocês são inspiração e exemplos de dedicação e esforço para mim. Muito obrigado por tudo.

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões bovinos enfrenta limitações significativas associadas ao estresse oxidativo gerado pelo ambiente subótimo de cultivo, o qual compromete a competência oocitária e a viabilidade embrionária. O zinco atua como um regulador metabólico e cofator enzimático essencial nesse processo, sendo as nanopartículas de óxido de zinco uma estratégia inovadora para ampliar sua biodisponibilidade e interação celular. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da suplementação de diferentes concentrações de NPZnO durante a maturação *in vitro* sobre a qualidade oocitária e o desenvolvimento embrionário bovino. Os resultados demonstraram que a concentração de 1,5 µg/mL promoveu a maior taxa de produção de blastocistos (60,5%), estatisticamente superior ao grupo controle (51,8%; $p < 0,05$), enquanto a concentração de 7,5 µg/mL induziu toxicidade bloqueio da maturação nuclear de oócitos, aumento de EROs e do índice apoptótico de blastocistos ($p < 0,05$). Apesar do efeito benéfico da concentração de 1,5 µg/mL, não houve diferença significativa no nível de EROs em oócitos em relação ao grupo controle ($p > 0,05$) e foi observado aumento da lipoperoxidação em embriões (55,1% em comparação aos 49,9% do grupo controle; $p < 0,05$), sugerindo uma ativação metabólica adaptativa. Conclui-se que as NPZnO apresentam efeito dose-dependente e indicam um possível comportamento hormético, com melhor desempenho observado na concentração de 1,5 µg/mL na PIVE bovina. Este trabalho evidencia que a modulação permite o suporte ao desenvolvimento embrionário dentro de uma janela terapêutica, atuando por vias de sinalização e regulação metabólica, independente de um efeito antioxidante clássico de neutralização direta de radicais livres.

Palavras-chave: Nanotecnologia; Biotecnologia; Estresse oxidativo; Oócitos; Blastocistos.

ABSTRACT

In vitro production of bovine embryos faces significant limitations associated with oxidative stress generated by suboptimal culture conditions, which compromise oocyte competence and embryo viability. Zinc acts as an essential metabolic regulator and enzymatic cofactor in this process, and zinc oxide nanoparticles are an innovative strategy to increase its bioavailability and cellular interaction. The objective of the present study was to investigate the effects of supplementing different concentrations of NPZnO during *in vitro* maturation on oocyte quality and bovine embryo development. The results showed that the concentration of 1.5 µg/mL promoted the highest blastocyst production rate (60.5%), statistically superior to the control group (51.8%; $p < 0.05$), while the concentration of 7.5 µg/mL induced toxicity, blocking oocyte nuclear maturation, increasing ROS and the apoptotic index of blastocysts ($p < 0.05$), while the concentration of 7.5 µg/mL induced toxicity, blocking oocyte nuclear maturation, increasing ROS and the apoptotic index of blastocysts ($p < 0.05$). Despite the beneficial effect of the 1.5 µg/mL concentration, there was no significant difference in the level of ROS in oocytes compared to the control group ($p > 0.05$), and an increase in lipoperoxidation was observed in embryos (55.1% compared to 49.9% in the control group; $p < 0.05$), suggesting adaptive metabolic activation. It is concluded that NPZnO have a dose-dependent effect and indicate possible hormetic behavior, with better performance observed at a concentration of 1.5 µg/mL in bovine IVEP. This study shows that modulation by nanoparticles supports embryonic development within a therapeutic window, acting through signaling and metabolic regulation pathways, independently of a classic antioxidant effect of direct neutralization of free radicals.

Keywords: Nanotechnology; Biotechnology; Oxidative stress; Oocytes; Blastocysts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Produção mitocondrial de EROs e principais vias de dano celular associadas ao estresse oxidativo	25
Figura 2 - Representação esquemática do delineamento experimental.....	40
Figura 3 - Imagens de NPZnO por microscopia eletrônica de varredura em diferentes escalas	48
Figura 4 - Espectros Raman (a) e Infravermelho por Transformada de Fourier (b) da amostra de NPZnO.....	49
Figura 5 - Efeito das NPZnO na atividade mitocondrial de oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i>	52
Figura 6 - Efeitos das NPZnO nos níveis de EROs em oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i>	53
Figura 7 - Efeitos das NPZnO na maturação nuclear de oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i>	54
Figura 8 - Efeito das diferentes concentrações de NPZnO na lipoperoxidação de blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i>	55
Figura 9 - Efeito das diferentes concentrações de NPZnO na atividade mitocondrial de blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i>	56
Figura 10 - Efeito das NPZnO no número total de blastômeros e na taxa de apoptose de blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i>	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tamanho hidrodinâmico, PDI e potencial zeta de NPZnO dispersas em meio MIV obtidos por DLS.....	47
Tabela 2 - Desenvolvimento pós-fecundação de oócitos maturados sob diferentes concentrações de NPZnO.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE	Ativação do genoma embrionário
APC/C	Complexo promotor da anáfase/ciclossoma
ARE	Elementos de Resposta Antioxidante
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina sérica bovina
cAMP	AMP cíclico
CCOs	Complexos cúmulus-oócito
CDK1	Quinase dependente de ciclina 1
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CTCF	Fluorescência Celular Total Corrigida
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DLS	Espalhamento dinâmico de luz (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GCL	Glutamato-cisteína ligase
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GVBD	Ruptura do envelope nuclear (<i>Germinal Vesicle Breakdown</i>)
HO-1	Heme oxigenase 1
IETS	Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (<i>International Embryo Technology Society</i>)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MPF	Fator Promotor de Maturação
MRE	Elementos de resposta a metais
MT-1	Metalotioneína 1
MT-2	Metalotioneína 2
mtDNA	DNA mitocondrial

MTF-1	Fator de transcrição responsivo a metais 1
MTs	Metalotioneínas
NOX	NADPH oxidase
NPZnO	Nanopartículas de óxido de zinco
NQO1	NAD(P)H:quinona oxidoreductase 1
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
PDI	Índice de polidispersão
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
RE	Retículo endoplasmático
-SH	Grupos sulfidril (tiol)
SOD	Superóxido dismutase
SOF	Fluido ovidutal sintético (<i>Synthetic Oviductal Fluid</i>)
SSC	Citrato de sódio salino (<i>saline-sodium citrate</i>)
TUDCA	Ácido tauroursodesoxicólico
TUNEL	Marcação de extremidades de DNA por transferência de desoxinucleotidil terminal (<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>)
UPR	Resposta a proteínas mal dobradas (<i>Unfolded Protein Response</i>)
VG	Vesícula germinativa
XOD	Xantina oxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	16
2.1.1 Maturação <i>in vitro</i>	17
2.1.2 Fertilização <i>in vitro</i>	19
2.1.3 Cultivo <i>in vitro</i>	20
2.1.4 Principais limitantes da PIVE	21
2.2 O DESEQUILÍBRIO REDOX NA PIVE	22
2.2.1 Fontes de EROs.....	22
2.2.2 Sistemas de defesa antioxidante de oócitos e blastocistos	26
2.2.3 Consequências do estresse oxidativo	28
2.3 NANOTECNOLOGIA E SUAS APLICAÇÕES NA BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO.....	29
2.4 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO	31
2.4.1 Papel biológico do zinco na reprodução.....	33
2.4.2 Mecanismos de ação da NPZnO	33
2.4.3 Biocompatibilidade e toxicidade.....	35
3 HIPÓTESE	37
4 OBJETIVOS	38
4.1 OBJETIVO GERAL	38
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
5 MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	40
5.1.1 Espalhamento de luz dinâmico	40
5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	41
5.1.3 Espectroscopia Raman e Infravermelho	41

5.2 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	41
5.2.1 Obtenção e seleção de oócitos	41
5.2.2 Maturação, fecundação e cultivo <i>in vitro</i>	42
5.3 QUANTIFICAÇÃO DE LIPOPEROXIDAÇÃO EM EMBRIÕES	43
5.4 AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR, ATIVIDADE MITOCONDRIAL E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM OÓCITOS	43
5.5 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL, NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS E ÍNDICE APOPTÓTICO EM EMBRIÕES	44
5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
6 RESULTADOS.....	47
6.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	47
6.1.1 Espalhamento de luz dinâmico	47
6.1.2 Microscopia eletrônica de varredura	47
6.1.3 Espectroscopias Raman e Infravermelho	48
6.2 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM NPZnO NAS TAXAS DE CLIVAGEM E BLASTOCISTOS.....	50
6.3 EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NPZnO NA ATIVIDADE MITOCONDRIAL, NÍVEL DE EROs E MATURAÇÃO NUCLEAR DE OÓCITOS	51
6.4 QUANTIFICAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO EM EMBRIÕES	54
6.5 EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NPZnO NA ATIVIDADE MITOCONDRIAL, NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS E ÍNDICE APOPTÓTICO EM EMBRIÕES	55
7 DISCUSSÃO	60
8 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos é uma técnica bastante utilizada na indústria e pesquisa pecuária, visando melhorar a eficiência reprodutiva e a qualidade genética do rebanho. Essa técnica consiste em três etapas subsequentes que simulam o ambiente *in vivo*: a maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos, a fertilização *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) dos zigotos até a fase de blastocistos, geralmente alcançada no sétimo dia após a fecundação (Gallego et al., 2022). Apesar da ampla aplicação, a técnica ainda enfrenta limitações importantes relacionadas ao estresse celular consequente do ambiente artificial, que frequentemente resulta em eficiência inferior à observada *in vivo*.

Nesse contexto, diversos fatores podem interferir no desenvolvimento embrionário, entre eles o estresse oxidativo, considerado um dos principais desafios dessa técnica. Diferente do ambiente fisiológico, o sistema *in vitro* expõe gametas e embriões a uma tensão de oxigênio atmosférica superior à do oviduto, além da exposição à luz e à ausência dos sistemas de neutralização naturais presentes nos fluidos reprodutivos (Soto-Heras; Paramio, 2020). As espécies reativas de oxigênio (EROs), geradas naturalmente no metabolismo celular, podem atingir níveis elevados no ambiente *in vitro*, ocasionando danos estruturais e funcionais em moléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos.

Para equilibrar essa produção, o oócito possui mecanismos de defesa enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GPx), e não enzimáticos, como a glutathione (GSH) (Cetica et al., 2001). Contudo, quando a produção de radicais supera essa capacidade de defesa, EROs como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) são capazes de atravessar membranas celulares, promovendo alterações mitocondriais, bloqueio do desenvolvimento celular, depleção de ATP e apoptose (Soto-Heras; Paramio, 2020). Esse desequilíbrio oxidativo está diretamente associado a perda de competência oocitária, que resulta em menores taxas de clivagem, redução na produção de blastocistos e diminuição da criotolerância dos embriões produzidos (Leite et al., 2017).

Na tentativa de mitigar esses danos, diversas estratégias de suplementação com antioxidantes convencionais, como melatonina, cisteamina, vitamina E e glutathione, têm sido testadas nos meios de MIV. No entanto, os resultados são inconsistentes devido à baixa estabilidade dessas moléculas no meio de cultura,

dificuldade de permeabilidade através da zona pelúcida ou rápida oxidação antes de exercerem efeito (Khalil et al., 2021). Essas limitações estimulam a busca por novos agentes que ofereçam maior estabilidade.

Diante desse cenário, a suplementação do meio de cultivo de oócitos e embriões bovinos com nanopartículas de óxido de zinco (NPZnO) desponta como uma abordagem inovadora e promissora para mitigar os efeitos deletérios das EROs e, assim, favorecer o desenvolvimento embrionário *in vitro* (Abdel-Halim; Moselhy; Helmy, 2018; Patrón-Romero et al., 2022). Essas NPs podem apresentar propriedades antioxidantes, sendo capazes de neutralizar a ação de EROs e proteger as células contra danos oxidativos (Mohd Yusof et al., 2022). A vantagem da aplicação em nanoescala está na elevada relação superfície-volume, que aumenta significativamente o número de sítios ativos disponíveis para a neutralização de EROs. Além disso, as nanopartículas permitem uma liberação controlada de íons Zn^{2+} e apresentam maior capacidade de internalização celular em comparação com outras fontes convencionais de zinco, o que pode potencializar a eficiência da ação (Albanese; Tang; Chan, 2012).

Considerando que o zinco é um mineral essencial, já reconhecido por atuar como cofator de importantes enzimas presentes durante o desenvolvimento embrionário (Picco et al., 2010), acredita-se que sua formulação na forma de nanopartículas possa ser ainda mais vantajosa do que o mineral em sua forma bulk (em escala maior de tamanho). Ao adicionar as NPZnO ao meio de maturação, espera-se que a sua atividade antioxidante atue na proteção dos complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) e embriões contra o estresse oxidativo, contribuindo para um ambiente mais favorável para o desenvolvimento embrionário. Dessa forma, a suplementação de NPZnO visa a modulação do ambiente redox para melhorar a competência oocitária.

Recentemente, um trabalho do nosso laboratório investigou o uso de NPZnO (1,0 e 1,5 $\mu\text{g/mL}$) na MIV bovina e demonstrou que a concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de aumentar a qualidade embrionária, evidenciada pelo maior número de células e redução de EROs no reaquecimento pós-vitrificação (Quintão et al., 2024). Contudo, esse estudo não observou aumento significativo nas taxas de produção de blastocistos, sugerindo que o potencial da nanotecnologia na PIVE ainda precisa ser investigado, principalmente no que tange à compreensão dos mecanismos de ação envolvidos na competência oocitária e desenvolvimento embrionário.

A proposta do uso de NPZnO como suplemento no meio de MIV de oócitos bovinos representa, portanto, uma abordagem inovadora e promissora para o aprimoramento da PIVE, com potencial para beneficiar tanto a indústria pecuária quanto as pesquisas em biotecnologia da reprodução. Apesar das evidências iniciais promissoras, ainda há uma escassez de dados na literatura sobre a interação dessas nanopartículas com o oócito bovino e seus efeitos na PIVE em diferentes concentrações. O presente estudo justifica-se pela necessidade de preencher essa lacuna, aprofundando o conhecimento sobre como as NPZnO podem otimizar a eficiência dessa biotecnologia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

A produção *in vitro* de embriões consolidou-se como uma das principais biotecnologias reprodutivas aplicadas à pecuária contemporânea, sendo definida como um conjunto de procedimentos que envolve a recuperação de oócitos, sua maturação, fertilização e cultivo em condições laboratoriais até o estágio de blastocisto (Ferré et al., 2020). Inicialmente, a técnica era restrita ao campo experimental, contudo, após diversos avanços metodológicos e tecnológicos nas últimas décadas, alcançou ampla aplicação comercial. Durante a década de 2010, esse progresso levou à superação da produção embrionária *in vivo* pelos sistemas *in vitro*, conforme dados da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) (Viana; Figueiredo; Siqueira, 2017). Esse avanço ajuda a compreender por que a PIVE passou a ocupar uma posição de relevância em programas produtivos e na pesquisa.

Nesse contexto, a PIVE destaca-se por sua capacidade de acelerar o ganho genético dos rebanhos, pois permite aumentar o número de descendentes provenientes de fêmeas com alto valor genético (Hansen, 2020). Diferente das biotecnologias convencionais, a PIVE possibilita a obtenção de oócitos de categorias animais que normalmente não participariam de programas reprodutivos, como novilhas pré-púberes, fêmeas gestantes em estágios iniciais ou animais com comprometimento reprodutivo adquirido (Ferré et al., 2020; Krisher; Herrick, 2024). No contexto da conservação genética, essa biotecnologia também se destaca por viabilizar a formação de bancos de germoplasma e otimizar o uso de sêmen sexado ou de reprodutores geneticamente superiores com disponibilidade limitada (Pontes et al., 2010). Além disso, a PIVE permite reduzir a influência de fatores climáticos sazonais e do ambiente reprodutivo *in vivo*, como variações na temperatura ambiente, estresse térmico, qualidade nutricional, condições fisiológicas da fêmea e estresse associado ao manejo, ampliando assim a previsibilidade do processo reprodutivo (Ferré et al., 2020; Viana; Figueiredo; Siqueira, 2017).

Estudos recentes vêm ajudando a entender melhor quais condições podem favorecer a produção embrionária *in vitro*, principalmente ao testar variações na maturação e no cultivo, como ajustes nos meios de cultivo, na tensão de oxigênio e

na utilização de suplementações, e relacionar essas mudanças com indicadores de qualidade oocitária e embrionária (Krisher; Herrick, 2024). Além disso, a PIVE é uma base importante para diferentes abordagens na pesquisa e em biotécnicas que dependem desse sistema, como micromanipulações, transferência nuclear e edição gênica, o que também contribui para estudos do desenvolvimento inicial (Hansel, 2003). Mais recentemente, a integração com ferramentas genômicas ampliou esse tipo de aplicação, o que tornou possível biópsias embrionárias e genotipagem/seleção antes da transferência, além de um maior controle de variáveis associadas à viabilidade e à criotolerância embrionária (Krisher; Herrick, 2024; Oliveira et al., 2023).

Do ponto de vista técnico, a PIVE envolve três etapas fundamentais, sendo elas a maturação *in vitro* determinante para a qualidade subsequente do embrião, a fertilização *in vitro* e o cultivo *in vitro*. O processo se inicia com a obtenção e seleção de complexos cúmulus-oócito (CCOs), a partir de ovários de abatedouro ou por aspiração folicular, seguido pela seleção morfológica de estruturas com maior número de células do cúmulus compactas e citoplasma homogêneo (Viana et al., 2004).

2.1.1 Maturação *in vitro*

A MIV tem como objetivo biológico principal promover a retomada da meiose, partindo do estágio de vesícula germinativa até a metáfase II (MII), caracterizando a maturação nuclear. Em paralelo, ocorre a maturação citoplasmática, associada à reorganização de organelas, à redistribuição de reservas energéticas e ao acúmulo de estoques de RNAs e proteínas que sustentam a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial (Ferré et al., 2020; Lodde et al., 2007). A competência adquirida nessa fase impacta diretamente a clivagem, a ativação do genoma embrionário e a capacidade de progressão até blastocisto, sendo frequentemente apontada como um dos principais gargalos biológicos da PIVE (Krisher; Herrick, 2024).

A maturação nuclear inicia-se com a retomada da meiose a partir do bloqueio na prófase I (estágio de Vesícula Germinativa). Esse processo envolve a condensação cromossômica, o rompimento do envelope nuclear (GVBD – *Germinal Vesicle Breakdown*), a progressão até metáfase I (MI) e a extrusão do primeiro corpúsculo polar, resultando na parada em metáfase II (MII) (Mingoti, 2000; Sirard et al., 2006). O controle deste ciclo é mediado pelo Fator Promotor de Maturação (MPF), um

complexo formado pela quinase dependente de ciclina (CDK1) e pela ciclina B (Bilodeau-Goeseels, 2012). Níveis elevados de AMP cíclico (cAMP) intraocitário mantêm o MPF inativo e o oócito em VG. Com o pico de hormônio luteinizante (LH) (*in vivo*) ou a aspiração do oócito (*in vitro*), ocorre a queda nos níveis de cAMP, que ativa o MPF e desencadeia a retomada da meiose (Adona et al., 2008; Conti et al., 2002).

A maturação citoplasmática, por sua vez, ocorre simultaneamente à nuclear e envolve eventos essenciais para o bloqueio da polispermia e a formação dos pronúcleos masculino e feminino (Van den Hurk; Zhao, 2005). Esse processo promove a reorganização de organelas, como a migração de grânulos corticais para a periferia, fundamental para a reação cortical pós-fertilização, e o retículo endoplasmático, que atua como reservatório de cálcio (Abeydeera, 2002). Um desafio crítico na PIVE é a assincronia entre esses dois processos, que pode comprometer o desenvolvimento embrionário (Ferreira et al., 2008).

Outro fator fortemente associado à maturação oocitária é a dinâmica mitocondrial e energética. As mitocôndrias desempenham um papel crucial nesse processo, sendo a principal fonte de trifosfato de adenosina (ATP) necessário para eventos de alta demanda energética, como a reorganização do fuso meiótico e a fertilização (Zhang et al., 2023). O conteúdo de ATP e o número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) também aumentam significativamente durante a maturação e estão correlacionados de forma positiva com a competência do oócito (Hallberg; Laskowski; Sjunnesson, 2025). Também, durante a maturação, observa-se uma mudança no padrão de distribuição dessas mitocôndrias, que se localizam predominantemente na periferia em oócitos imaturos e migram para o centro à medida que o oócito atinge a MII (Batistela et al., 2023). Falhas neste processo estão associadas à redução da competência de desenvolvimento (Zhao et al., 2018).

Por fim, a comunicação entre oócito e células do *cumulus* também é essencial para a regulação metabólica e coordenação da maturação nuclear. As células do *cumulus* estão conectadas por junções comunicantes (*gap junctions*), que permitem a transferência direta de pequenas moléculas reguladoras, como nucleotídeos cíclicos (cAMP e cGMP), metabólitos e aminoácidos, essenciais para manter o bloqueio meiótico (Sugiura et al., 2010; Bilodeau-Goeseels, 2012). A interrupção dessa comunicação é a responsável pela queda de cGMP e cAMP, reativando a meiose (Adona et al., 2008).

A interação oócito-células do *cumulus* também apresenta um importante papel em relação ao suporte metabólico e expansão. As células do *cumulus* metabolizam a glicose para fornecer piruvato ao oócito, que tem baixa capacidade de produção dessa molécula, o que contribui para o suprimento de ATP (Richani et al., 2021). Além disso, fatores secretados pelo oócito, como GDF9 e BMP15, estimulam as células do *cumulus* a proliferar e sintetizar ácido hialurônico e prostaglandinas, resultando na expansão do *cumulus*, um marcador visual de maturação e requisito para a ovulação e fertilização (Nuttinck et al., 2011).

2.1.2 Fertilização *in vitro*

A FIV consiste na co-incubação de CCOs maturados com espermatozoides selecionados, com o objetivo de mimetizar as condições fisiológicas da ampola da tuba uterina, sítio natural da fecundação (Mello et al., 2016). O sucesso dessa etapa depende dessa replicação, ao fornecer condições adequadas de temperatura, atmosfera gasosa e composição do meio para sustentar o metabolismo dos gametas e permitir a interação entre o espermatozoide e o oócito (Lonergan et al., 2001).

No ambiente *in vivo*, os espermatozoides sofrem uma capacitação funcional durante o transporte pelo trato reprodutivo da fêmea, enquanto na FIV, essa capacitação é induzida artificialmente para que ocorra a fecundação. Esse processo envolve alterações na fluidez da membrana plasmática e a hiperativação da motilidade, requisitos para a reação acrossômica e a penetração na zona pelúcida (Varago; Mendonça; Lagares, 2008). Para isso, a heparina, um glicosaminoglicano, é o agente capacitante mais utilizado. Sua ação ocorre através da interação com proteínas carreadoras de heparina (HBP) presentes no plasma seminal, promovendo as modificações bioquímicas na membrana do espermatozoide necessárias para a fertilização (Mello et al., 2016). Além disso, para otimizar a função do gameta masculino, o meio de fertilização é frequentemente suplementado com penicilamina, hipotaurina e epinefrina. Destes, a epinefrina atua no estímulo da motilidade, enquanto a hipotaurina e a penicilamina auxiliam na manutenção da viabilidade e motilidade durante o período de co-cultivo, o que favorece a penetração no oócito (Parrish, 2014).

2.1.3 Cultivo *in vitro*

A etapa da CIV compreende o período entre a formação do zigoto e o estágio de blastocisto, durando 7 dias (D0 = FIV) e podendo se estender até o dia 8 ou 9 (Mello et al., 2016). Após a fecundação, o zigoto inicia divisões mitóticas sucessivas. No D3, avalia-se a taxa de clivagem, momento em que os embriões devem ter superado as primeiras divisões celulares (Pinheiro et al., 2024).

Morfologicamente, o embrião transita do estágio de mórula, uma massa compacta de células com separação nítida entre os blastômeros, para o estágio de blastocisto inicial, caracterizado pela formação da blastocele e o início da diferenciação celular (Batistela et al., 2023). No estágio de blastocisto (D7), ocorre uma diferenciação clara em duas estruturas celulares: o trofoblasto, que dará origem aos anexos embrionários, e a massa celular interna, que formará o feto (Assaf, 2007).

Metabolicamente, essa fase pode ser dividida em duas. Nos estágios iniciais de clivagem, o embrião depende predominantemente de substratos como piruvato e lactato. Após o estágio de mórula, ocorre uma mudança metabólica significativa, onde a glicose se torna o substrato preferencial para dar suporte à formação e expansão da blastocele e à síntese proteica necessária no desenvolvimento do blastocisto (Abu El-Naga et al., 2024). Essa transição é um exemplo da dependência do embrião das condições de cultivo, uma vez que a composição do meio modula a disponibilidade de substratos e a tensão de oxigênio interfere no equilíbrio redox, o que pode favorecer ou prejudicar o desenvolvimento embrionário.

Outro evento crucial da CIV é a transição materno-zigótica, um dos períodos de maior vulnerabilidade do desenvolvimento embrionário *in vitro*. Logo após a fecundação, o desenvolvimento embrionário é sustentado exclusivamente por transcritos de mRNA e proteínas de origem materna acumulados no oócito durante a maturação citoplasmática. Em bovinos, a ativação do genoma embrionário (AGE) ocorre especificamente no estágio de 8 a 16 células (Assaf, 2007). Nesse momento, os estoques maternos começam a se esgotar e o embrião passa gradualmente a ativar sua própria atividade transcricional. Falhas nessa transcrição resultam no bloqueio embrionário (*8-16 cell block*), levando à parada das divisões celulares e, conseqüentemente, à degeneração embrionária, um dos principais pontos de perda da PIVE (De Camargo et al., 2022).

Portanto, dois fatores críticos da CIV são o meio de cultura e a tensão de oxigênio. O meio de cultura comumente utilizado é o Fluido Ovidutal Sintético (SOF – *Synthetic Oviductal Fluid*), que busca replicar as concentrações de eletrólitos, fontes de energia e aminoácidos presentes *in vivo*. A inclusão de aminoácidos é fundamental, pois eles atuam como precursores de síntese proteica, reguladores de pH intracelular e fontes de energia (Assaf, 2007). Em relação à tensão de oxigênio, o ambiente do oviduto e útero é hipóxico, com concentrações de oxigênio menores que a atmosfera (De Munck et al., 2019). Contudo, muitos sistemas de cultivo utilizam a tensão de 20% de oxigênio (Báez et al., 2024). O excesso de oxigênio *in vitro* favorece o desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante do embrião, resultando em estresse oxidativo (Guemra et al., 2013). Estudos indicam que a alta tensão de oxigênio pode alterar a expressão de genes relacionados a esse estresse, como a regulação de SOD2 e GPX1, e que o cultivo em baixa tensão promove melhores taxas de desenvolvimento e qualidade de blastocistos (Corrêa et al., 2008).

2.1.4 Principais limitantes da PIVE

Apesar dos avanços metodológicos, a eficiência da PIVE ainda é inferior à observada em sistemas *in vivo*, com taxas de formação de blastocistos geralmente variando entre 30% e 40% (Krisher; Herrick, 2024). Embriões produzidos *in vitro* podem apresentar mudanças decorrentes do ambiente de cultivo associadas à baixa qualidade, como alterações morfológicas, metabólicas e de expressão gênica (Sudano et al., 2016). Um dos principais fatores limitantes é o acúmulo excessivo de lipídios no citoplasma embrionário, especialmente em sistemas que utilizam soro fetal bovino como fonte proteica. Esse fenômeno está associado à maior sensibilidade à criopreservação e à redução da viabilidade embrionária pós-descongelamento (Salek et al., 2025).

Outro desafio central refere-se ao estresse oxidativo, considerado como fator crítico na PIVE, uma vez que o ambiente de cultivo pode favorecer o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade antioxidante celular, o que compromete a competência oocitária e a qualidade embrionária (Ueda et al., 2002). Algumas condições do sistema *in vitro*, como a tensão de oxigênio superior à fisiológica, contribuem para o aumento de EROs e podem desencadear alterações

funcionais, incluindo alterações mitocondriais, bloqueio do desenvolvimento celular, depleção de ATP e apoptose (Guerin, 2001). Sendo assim, compreender o ambiente redox e estratégias capazes de modulá-lo é fundamental para o aprimoramento da PIVE.

2.2 O DESEQUILÍBRIO REDOX NA PIVE

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade de defesa antioxidante de neutralizá-los (Cetica et al., 2001). Apesar das EROs, em concentrações fisiológicas, atuarem como moléculas sinalizadoras essenciais para processos como a capacitação espermática, reação acromossômica, ativação oocitária e clivagem embrionária (Sunuwar; Heo, 2026; Torres-Osorio et al., 2019), a sua produção excessiva no ambiente *in vitro* supera as defesas celulares. Isso resulta em danos a lipídios, proteínas e DNA, comprometendo a viabilidade e o desenvolvimento do embrião (Kitagawa et al., 2004).

2.2.1 Fontes de EROs

Na PIVE, os gametas são removidos do seu ambiente fisiológico natural e são expostos a condições artificiais que aumentam a produção de EROs, podendo ter origem em fontes exógenas ou endógenas.

Em relação às fontes exógenas, a tensão de oxigênio é um dos fatores mais críticos. Enquanto essa tensão no oviduto e útero de mamíferos varia fisiologicamente entre 2% e 8%, a cultura *in vitro* é frequentemente realizada sob tensão de 20% (Keane; Ealy, 2024). A exposição a esse excesso de oxigênio aumenta a atividade de enzimas oxidases dependentes de oxigênio e sobrecarrega as defesas antioxidantes, resultando em uma elevação dos níveis intracelulares de ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Leite et al., 2017). A exposição à luz durante a manipulação dos gametas e embriões também é um fator exógeno de produção de EROs. Essa exposição induz a foto-oxidação de componentes orgânicos presentes nos meios de cultura, como a riboflavina e o HEPES, o que pode gerar EROs nocivas como o oxigênio singleto e H_2O_2 , induzir danos diretos ao DNA e prejudicar a

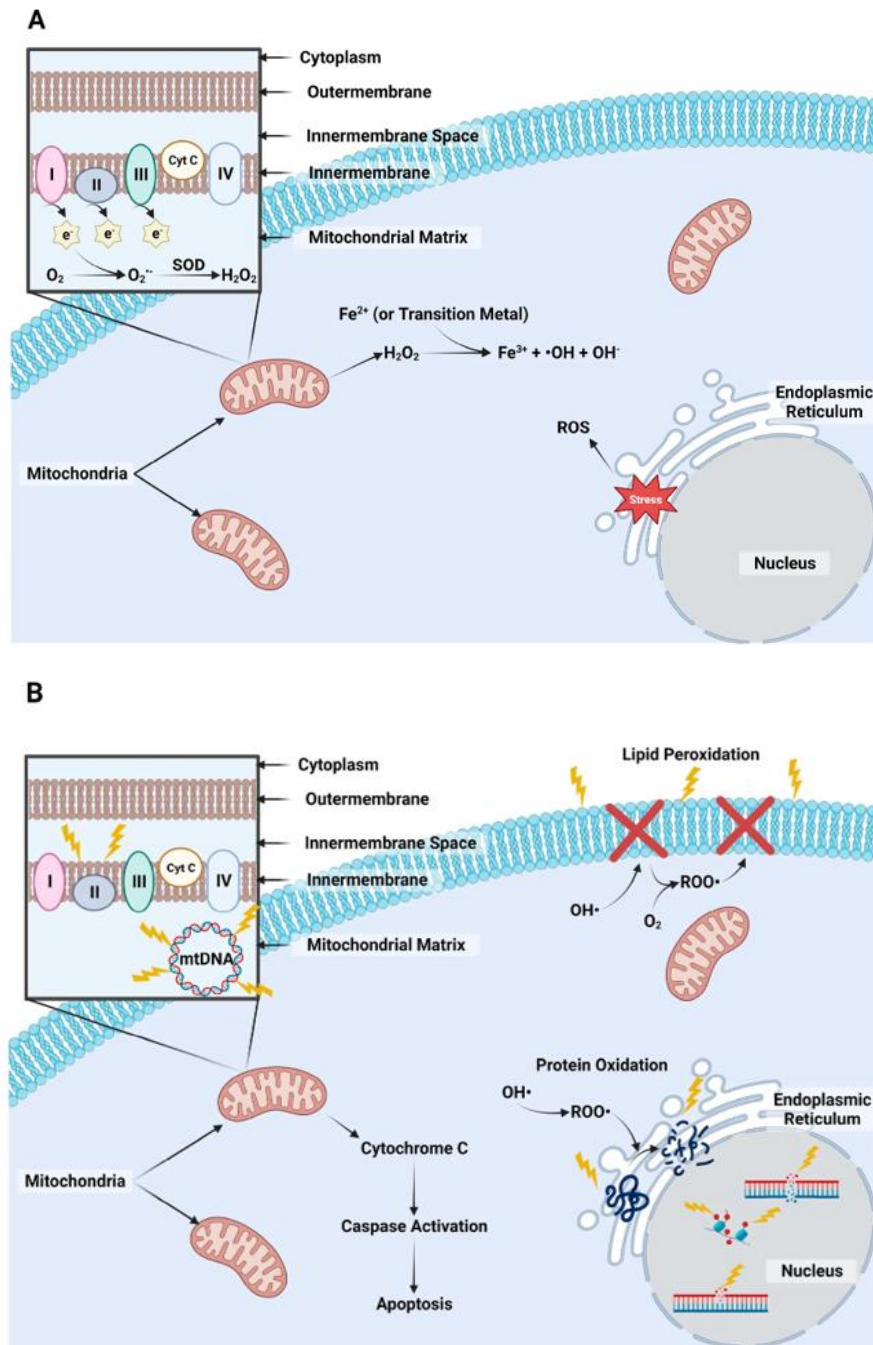
integridade das membranas mitocondriais (Sunuwar; Heo, 2026; Torres-Osorio et al., 2019). Deve-se considerar também a composição dos meios de cultura. A presença de íons de metais de transição, como ferro (Fe^{2+}) e cobre (Cu^{2+}), na água ou reagentes, catalisa a reação de Fenton, onde o H_2O_2 é convertido no radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), que é altamente reativo e letal ao gameta e embrião, pois não existem sistemas enzimáticos eficientes para neutralizá-lo diretamente. Além disso, altas concentrações de glicose no meio podem, através da auto-oxidação e da glicação de proteínas, aumentar a produção de EROs e competir com a captação de substratos antioxidantes (Rubessa et al., 2016). Por fim, a suplementação com SFB, embora forneça fatores de crescimento, introduz também a enzima amino-oxidase. Essa enzima oxida poliaminas, como a espermina e espermidina, presentes no meio ou produzidas pelo embrião, o que pode gerar H_2O_2 e aldeídos como subprodutos (Torres-Osorio et al., 2019).

Mesmo na ausência de fatores externos estressantes, o próprio metabolismo do oócito e do embrião gera EROs como subprodutos da produção de energia. A mitocôndria é a principal fonte endógena. Durante a fosforilação oxidativa (OXPHOS), ocorre o vazamento de elétrons, principalmente nos Complexos I (NADH desidrogenase) e III (ubiquinona-citocromo c redutase) da membrana mitocondrial interna (Mesalam et al., 2020; Sunuwar; Heo, 2026). Esses elétrons vazados reagem diretamente com o oxigênio molecular para formar o ânion O_2^- , precursor da maioria das outras EROs (Rocha-Frigoni et al., 2015). Além disso, existe uma conexão entre o estresse oxidativo e o estresse do retículo endoplasmático (RE). O acúmulo de proteínas mal dobradas no RE desencadeia a Resposta a Proteínas Mal Dobradas (UPR), que eleva a produção de EROs no citoplasma e na mitocôndria e cria um ciclo de toxicidade (Divvela et al., 2025; Pioltine et al., 2021). O tratamento com chaperonas químicas, como o ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA), tem mostrado mitigar essa via de produção de EROs (Pioltine et al., 2021).

Além da respiração mitocondrial, sistemas enzimáticos como a NADPH oxidase (NOX) na membrana plasmática e xantina oxidase (XOD) no citosol são geradores ativos de O_2^- e H_2O_2 (Sunuwar; Heo, 2026). A atividade dessas enzimas pode ser exacerbada por condições de cultura subótimas ou pela presença de espermatozoides mortos ou anormais na fertilização, que liberam grandes quantidades de EROs via oxidação de aminoácidos aromáticos (Bollwein; Bittner, 2018). Por fim, deve-se considerar também o metabolismo de lipídios. Oócitos e embriões bovinos acumulam

gotículas lipídicas citoplasmáticas, especialmente na presença de soro. A β -oxidação desses ácidos graxos na mitocôndria para gerar energia é uma produtora potente de EROs. O excesso de lipídios intracelulares não serve apenas como substrato para peroxidação, mas também sobrecarrega a capacidade oxidativa mitocondrial, aumentando o vazamento de elétrons (Rocha-Frigoni et al., 2015; Salek et al., 2025) (Figura 1).

Figura 1 - Produção mitocondrial de EROs e principais vias de dano celular associadas ao estresse oxidativo



Representação esquemática da geração de EROs e de suas consequências celulares. **(A)** Produção de EROs associada à cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, com formação e conversão de $O_2^{\bullet -}$ em H_2O_2 e participação de metais de transição na geração de radicais mais reativos. **(B)** Em condições de estresse oxidativo, acúmulo de EROs com dano a lipídios, proteínas e DNA e mtDNA, levando à disfunção mitocondrial, liberação de citocromo c, ativação de caspases e apoptose. (Adaptado de Keane; Ealy, 2024)

2.2.2 Sistemas de defesa antioxidante de oócitos e blastocistos

A homeostase redox no microambiente do oócito e do embrião bovino é mantida por uma rede complexa de sistemas de defesa antioxidante, que atuam de forma coordenada para neutralizar as EROs durante o cultivo *in vitro* (Crocomo et al., 2023). Estes sistemas são classificados em enzimáticos e não enzimáticos e desempenham papéis complementares na preservação da viabilidade celular e da competência de desenvolvimento (Cetica et al., 2001).

A defesa enzimática corresponde à primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo e atua diretamente na conversão de EROs em substâncias menos reativas. Esse sistema funciona através de uma hierarquia bioquímica, onde a ação de uma enzima depende do produto da anterior para completar a neutralização das EROs (Crocomo et al., 2023; Keane; Ealy, 2024).

A SOD desempenha o papel inicial nessa hierarquia. Sua função primária é catalisar a dismutação do O_2^- , convertendo-o em H_2O_2 e oxigênio molecular (O_2) (Cetica et al., 2001). Existem isoformas distintas da SOD que atuam em compartimentos celulares específicos para manter a homeostase: a SOD1 (Cu/Zn-SOD) está presente no citoplasma e núcleo, a SOD2 (Mn-SOD) se localiza na matriz mitocondrial e a SOD3 é extracelular (Keane; Ealy, 2024).

Após a ação da SOD, o H_2O_2 gerado é neutralizado pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (Torres-Osorio et al., 2019). A GPx reduz o H_2O_2 em água utilizando a glutathiona reduzida (GSH) como doador de elétrons, processo que oxida a glutathiona (GSSG) (Luberda, 2005). Essa enzima também atua na redução de hidroperóxidos lipídicos, protegendo as membranas celulares. Já a catalase converte o H_2O_2 em água e oxigênio molecular. Diferente da GPx, a catalase não requer GSH, contudo, ela se localiza predominantemente no peroxissomo, e atua com mais eficiência quando há altas concentrações de peróxido (Torres-Osorio et al., 2019).

Portanto, em resumo, a hierarquia se inicia com a SOD neutralizando o O_2^- primário e gerando H_2O_2 , que é eliminado pela ação conjunta da CAT e GPx em sequência. O equilíbrio na atividade dessas enzimas é crucial, pois, por exemplo, um aumento na atividade de SOD sem um aumento correspondente de CAT ou GPx pode resultar no acúmulo tóxico de H_2O_2 (Cetica et al., 2001; Keane; Ealy, 2024; Torres-Osorio et al., 2019).

Por outro lado, os antioxidantes não enzimáticos funcionam como sequestradores de EROs e cofatores essenciais para as enzimas antioxidantes. A GSH é o principal antioxidante não proteico nas células de mamíferos, composta por glutamato, cisteína e glicina (Wu et al., 2004). Além de sua importância na neutralização direta de EROs e como substrato para o GPx, ela também desempenha funções na formação e manutenção do fuso meiótico, na descondensação do pronúcleo masculino após a fertilização e na proteção do embrião antes da ativação do genoma (Crocomo et al., 2023; Di Meo et al., 2016).

Outras moléculas presentes nos fluidos foliculares ou meios de cultura também participam da defesa antioxidante. A vitamina C (ácido ascórbico) e a vitamina E (α -tocoferol) atuam ao prevenir a peroxidação lipídica nas membranas e neutralizando EROs. Além disso, aminoácidos, como a cisteamina, também são importantes. Esse aminoácido, por exemplo, facilita a síntese de GSH ao reduzir a cistina extracelular em cisteína, permitindo sua captação pela célula, o que é crítico para elevar os estoques de GSH durante a maturação oocitária (Halliwell; Whiteman, 2004).

Devido às constantes mudanças celulares e moleculares ao longo do desenvolvimento oocitário e embrionário, a capacidade de resposta ao estresse oxidativo varia, principalmente entre etapas antes e pós ativação do genoma embrionário. Durante a MIV, o oócito acumula de forma ativa GSH, sendo que oócitos maduros apresentam níveis significativamente maiores de GSH do que oócitos imaturos (Şen, 2021). A presença de células do *cumulus* é crucial, pois estas células protegem o oócito contra o estresse oxidativo e auxiliam na síntese de GSH. De acordo com Cetica et al. (2001), oócitos desnudados apresentam atividades enzimáticas de SOD, GPx e catalase significativamente menores em comparação com CCOs completos (Cetica et al., 2001).

Após a fertilização, os níveis de GSH diminuem drasticamente, atingindo o mínimo durante os estágios de clivagem, momento em que ocorre um pico na produção de EROs. Nesse período, o embrião depende quase exclusivamente dos estoques de transcritos de enzimas antioxidantes (SOD e GPx) e GSH acumulados durante a oogênese (Gimeno et al., 2021). A ativação do genoma embrionário, nos estágios entre 8 e 16 células, marca um ponto de virada, onde, a partir dele, o embrião recupera a capacidade de sintetizar GSH e expressar genes relacionados às respostas antioxidantes (Cañón-Beltrán et al., 2021).

2.2.3 Consequências do estresse oxidativo

Quando os sistemas de defesa antioxidantes de oócitos e embriões são superados, ocorre o estado de estresse oxidativo. Esse desequilíbrio pode resultar em diversos efeitos deletérios que comprometem a integridade estrutural e funcional dessas estruturas, como lipoperoxidação de membranas, danos ao DNA e oxidação de proteínas, gerando falhas no desenvolvimento (bloqueio ou apoptose) ou na produção de blastocistos de baixa qualidade (Crocomo et al., 2023; Leite et al., 2017; Ratchamak et al., 2024).

Devido à alta concentração de lipídios intracelulares e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) nas membranas, a peroxidação lipídica é considerada um dos efeitos tóxicos mais críticos (Ratchamak et al., 2024). O processo se inicia pelo radical hidroxila, que sequestra um átomo de hidrogênio dos AGPIs, gerando radicais alquila. Estes reagem com o oxigênio para formar radicais peroxila, que, por sua vez, atacam outros lipídios, gerando uma reação em cadeia que propaga o dano (Lima; Abdalla, 2001). Esse processo compromete a fluidez e a integridade funcional das membranas celulares, mitocondriais e nucleares. A alteração na permeabilidade da membrana leva à perda de seletividade no transporte de nutrientes e íons, causando a liberação do conteúdo de organelas e morte celular. Além disso, de acordo com Ratchamak et al. (2024), a lipoperoxidação gera subprodutos tóxicos, como o malondialdeído (MDA), cujos níveis elevados estão associados à redução da competência oocitária, especialmente em animais em envelhecimento (Ratchamak et al., 2024).

Em relação aos danos ao DNA, o estresse oxidativo atinge tanto o DNA genômico, quanto o mitocondrial (mtDNA). As EROs induzem lesões nas bases nitrogenadas, sendo a formação de 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dG) a modificação mais comum. Em níveis elevados, o estresse oxidativo causa quebras de fita simples e dupla no DNA que, se não reparadas, levam à fragmentação nuclear e instabilidade genômica (Keane; Ealy, 2024; Leite et al., 2017). Já o mtDNA é suscetível devido à sua proximidade com a fonte de produção de EROs e à ausência de histonas protetoras. Além disso, o estresse oxidativo pode alterar o perfil de metilação do DNA e as modificações de histonas, o que prejudica a reprogramação epigenética necessária para o desenvolvimento embrionário inicial (Feng et al., 2024).

Por fim, quanto à oxidação de proteínas, as EROs, especialmente o radical hidroxila, reagem com as cadeias laterais de aminoácidos, levando à formação de

ligações cruzadas, fragmentação e agregação de proteínas. Essas modificações estruturais resultam na perda de função enzimática, inativação de canais iônicos e dobramento incorreto de proteínas, o que pode desencadear o estresse do retículo endoplasmático (Crocomo et al., 2023).

A acumulação desses danos estruturais pode ter dois efeitos, o bloqueio do desenvolvimento (interrupção do ciclo celular) ou a morte celular programada (ativação coordenada de vias de morte celular). A partir da disfunção mitocondrial, com a permeabilidade da membrana mitocondrial afetada, ocorre a liberação de citocromo C para o citoplasma, o que desencadeia a cascata de ativação das caspases (proteases que executam a apoptose). Estudos demonstram que embriões cultivados sob altas tensões de oxigênio apresentam maior expressão de genes pró-apoptóticos, como BAX, e maior incidência de apoptose (Leite et al., 2017; Yuan et al., 2003). Quanto ao bloqueio do desenvolvimento, embriões que sofrem danos oxidativos severos, mas que não entram em apoptose, podem sofrer parada no ciclo celular. O estresse oxidativo afeta a função do fuso meiótico e a segregação cromossômica, levando a aneuploidias e falhas na clivagem ou na transição de mórula para blastocisto (Feugang et al., 2005).

Diante dos desafios relacionados ao estresse oxidativo e às limitações dos sistemas de cultivo *in vitro*, novas abordagens vêm sendo investigadas para melhorar a eficiência da PIVE, entre elas o uso da nanotecnologia.

2.3 NANOTECNOLOGIA E SUAS APLICAÇÕES NA BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO

A nanotecnologia é definida como a ciência e a engenharia dedicadas ao desenho, síntese, caracterização e aplicação de materiais e sistemas através do controle da matéria em escala nanométrica, que compreende a faixa de 1 a 100 nanômetros (Rizvi; Saleh, 2018). Apesar dos conceitos teóricos terem sido introduzidos por Richard Feynman em 1959, o termo foi criado por Norio Taniguchi, em 1974, e refere-se à manipulação precisa de átomos e moléculas (Rasool et al., 2025).

A característica que diferencia os nanomateriais de seus equivalentes em escalas maiores é a grande alteração da relação superfície-volume. À medida que o

raio de uma partícula diminui, a área de superfície aumenta em relação ao seu volume (Khushnood, 2024). Essa maior exposição de átomos na superfície aumenta a reatividade química dos nanomateriais, além de melhorar sua solubilidade e capacidade catalítica, permitindo interações diretas e eficientes com biomoléculas e ampliando o contato com membranas celulares e proteínas, por exemplo, o que pode influenciar a captação e os efeitos observados nos sistemas biológicos (Nel et al., 2006).

Os nanomateriais são categorizados com base em sua composição química e dimensionalidade, sendo divididos em inorgânicos, orgânicos e à base de carbono. Os inorgânicos incluem nanopartículas metálicas, como ouro e prata e óxidos metálicos, como óxido de zinco, óxido de ferro e dióxido de titânio. Essas partículas possuem propriedades ópticas, magnéticas e elétricas únicas e são exploradas para diagnósticos, bioimagem e terapias antimicrobianas (Rasool et al., 2025). Já os nanomateriais orgânicos correspondem aos lipossomas, micelas, dendrímeros e nanopartículas poliméricas. Eles apresentam alta biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de encapsulação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, o que os torna importantes no contexto de sistemas de entrega controlada e redução de toxicidade sistêmica (Kameni; Dlamini; Feugang, 2024; Shah; Mir; Bashir, 2017). Por fim, os nanomateriais à base de carbono incluem nanotubos de carbono, grafeno e fulerenos. São frequentemente aplicados em biossensores e engenharia de tecidos devido à alta resistência mecânica e condutividade elétrica (Barhoum et al., 2022). A interação celular dos nanomateriais é controlada por suas propriedades físico-químicas, como tamanho e carga superficial. Ao entrarem em contato com meios biológicos, as nanopartículas adquirem uma “corona de proteínas” (*protein corona*), que define sua identidade biológica e influencia a captação celular e o destino intracelular (Das et al., 2016).

As aplicações da nanotecnologia na biotecnologia da reprodução têm permitido intervenções capazes de superar limitações biológicas que afetam a eficiência dos protocolos laboratoriais e do campo. Na criopreservação de gametas e embriões, por exemplo, o uso de nanomateriais surge como uma alternativa promissora para diminuir os danos celulares e o estresse oxidativo causado pelo congelamento. Estudos demonstram que a suplementação de diluentes de sêmen com nanopartículas de selênio e de óxido de zinco auxilia na preservação da integridade da membrana plasmática e da motilidade pós-descongelamento (Heidari et al., 2018;

Khalil et al., 2019). Em pequenos ruminantes, a aplicação de NPZnO foi capaz de elevar significativamente a motilidade progressiva e a taxa de sobrevivência espermática (Heidari et al., 2018). Além do controle redox, Zhou et al. (2015) usou nanopartículas de hidroxiapatita para reduzir a formação de cristais de gelo durante a vitrificação, minimizando lesões mecânicas às células (Zhou et al., 2015). Um outro exemplo está no trabalho de Odhiambo et al. (2014), onde nanopartículas magnéticas revestidas com lectinas foram utilizadas para a remoção seletiva de espermatozoides danificados através de uma técnica chamada de nanopurificação (Odhiambo et al., 2014).

Outra área de aplicação relevante da nanotecnologia na biotecnologia da reprodução é referente ao desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos e hormônios, chamados de *drug delivery*. Hashem et al. (2023) utilizaram nanopartículas de quitosana carregadas de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) como um novo sistema de liberação para a otimização da resposta ovariana em protocolos de superovulação (Hashem et al., 2023). Da mesma forma, no trabalho de Lavanya e colaboradores (2024), foram sintetizadas nanofibras de pulalano carregadas com progesterona para liberação controlada do hormônio e maior controle do ciclo estral, através de uma administração intravaginal mais eficiente e duradoura (Lavanya et al., 2024). Por fim, o surgimento de nanobiossensores elevou a sensibilidade dos diagnósticos reprodutivos, permitindo a detecção do estro por meio de sensores colorimétricos ou de fluorescência infravermelha (Haroon; Stine, 2023; Manikkaraja et al., 2020), até o diagnóstico rápido de patógenos do trato reprodutivo via dispositivos *lab-on-a-chip* (Rasool et al., 2025).

2.4 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO

O óxido de zinco (ZnO) é um composto inorgânico semicondutor do grupo II-VI, caracterizado por uma elevada energia de ligação e um *band gap* largo à temperatura ambiente (Haidari; Rahmani, 2025). Estruturalmente, as NPZnO cristalizam-se predominantemente na forma wurtzita hexagonal, que é a fase termodinamicamente mais estável sob condições ambientais (Zhou et al., 2023). Nessa rede cristalina, os íons de zinco e oxigênio estão dispostos tetraedricamente, o que confere ao material propriedades piezoelétricas únicas (Mendes et al., 2025).

Embora o ZnO apresente estabilidade química e térmica, sua forma em nanoescala permite a modulação de sua morfologia, influenciando diretamente suas propriedades físico-químicas e reatividade biológica (Hegde, 2024).

A redução de tamanho do ZnO para a escala nanométrica resulta em um aumento da relação superfície-volume, expondo uma fração maior de átomos na superfície da partícula (Rupasinghe, 2011). Essa alta área de superfície potencializa a capacidade das NPZnO de adsorver proteínas do meio biológico, formando uma corona de proteínas que altera a identidade biológica da partícula e influencia sua captação celular e biocompartibilidade (Mohammad et al., 2023; Srivastav et al., 2019). Além disso, a elevada reatividade superficial e a presença de defeitos estruturais são relacionadas à geração de EROs, um dos mecanismos de sua atividade biológica e potencial toxicidade (Mendes et al., 2025).

Em meios líquidos, as NPZnO apresentam instabilidade coloidal devido à alta energia superficial e à força iônica do meio, o que pode resultar na formação de aglomerados ou agregados (Wu; Harper; Harper, 2019). Em ambientes ácidos ou na presença de ligantes orgânicos fortes (como componentes de meios de cultura), ocorre uma dissolução acelerada, que libera íons zinco livres (Eixenberger et al., 2017; Reed et al., 2012). Essa liberação iônica é considerada o mecanismo principal para a biodisponibilidade do mineral e para os efeitos biológicos observados, uma vez que a nanopartícula atua como um “facilitador de entrada” na célula, liberando altas concentrações de zinco após a dissolução (Haidari; Rahmani, 2025). Dessa forma, características como a interação superficial e a formação da corona proteica podem oferecer efeitos benéficos em condições controladas, mas também favorecer respostas pró-oxidantes e citotóxicas, dependendo do contexto experimental e da concentração utilizada.

2.4.1 Papel biológico do zinco na reprodução

O zinco é o segundo mineral mais abundante no organismo e desempenha um papel essencial na fisiologia celular, sendo um componente estrutural, catalítico e regulador importante para o crescimento, imunidade e reprodução (Gultekin et al., 2025). Na fisiologia reprodutiva, o zinco atua como um sinalizador intracelular e cofator para mais de 300 metaloenzimas, incluindo as polimerases de DNA e RNA, essenciais para a replicação e transcrição gênica (Akil et al., 2025).

Em relação à homeostase redox, o zinco é considerado um modulador crucial. Em sua forma iônica, esse mineral é eletronicamente estável, ou seja, não doa nem recebe elétrons com facilidade, o que lhe permite estabilizar moléculas e proteger grupos sulfidril de proteínas contra a oxidação (Powell, 2000). No contexto dos oócitos e embriões, além de estabilizar a estrutura da cromatina e regular a expressão gênica via fatores de transcrição “*zinc-fingers*” (Akil et al., 2025), o zinco coordena a defesa contra o estresse oxidativo, prevenindo a peroxidação lipídica e danos ao DNA que comprometem a competência do desenvolvimento (Gultekin et al., 2025). Ainda, o zinco é fundamental para a ativação oocitária através da *zinc spark* (“centelha de zinco”), uma liberação de íons que ocorre na fertilização e é essencial para a retomada do ciclo celular (Kageyama et al., 2025).

2.4.2 Mecanismos de ação da NPZnO

Devido à elevada relação superfície-volume mencionada anteriormente, essas nanopartículas apresentam uma interação intensa com os sistemas biológicos (Cai et al., 2025). O mecanismo de ação é misto, ocorrendo tanto de forma extra quanto intracelular, e envolve a atividade da nanopartícula íntegra ou a liberação de íons Zn^{2+} após a dissolução (Sehsah et al., 2019). Na literatura, os efeitos atribuídos às NPZnO são, em grande parte, explicados pelas vias propostas, e podem variar de acordo com o sistema biológico e as condições do experimento. A liberação desses íons pelas NPZnO pode contribuir para o sistema de defesa antioxidante através de mecanismos moleculares complexos.

O zinco liberado pode modular o fator de transcrição Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), principal regulador da resposta antioxidante e de

desintoxicação das células. Em condições basais, o Nrf2 é mantido inativo no citoplasma pela proteína Keap1. O aumento de zinco, ou um pequeno estresse hormético induzido pela nanopartícula, pode oxidar os resíduos de cisteína da Keap1, liberando o Nrf2 para se transportar ao núcleo. Uma vez no núcleo, o Nrf2 se liga aos Elementos de Resposta Antioxidante (ARE) no DNA, induzindo a transcrição de uma bateria de enzimas citoprotetoras, como a heme oxigenase-1 (HO-1), a NAD(P)H:quinona oxidoreductase 1 (NQO1) e as subunidades da glutamato-cisteína ligase (GCL), enzima limitante para a síntese de glutatona (GSH) (Marreiro et al., 2017; Sehshah et al., 2019). Ha et al. demonstraram que a administração de 100-150 μM de zinco em células ARPE-19, linhagem de células epiteliais pigmentares da retina humana, aumentou os níveis de mRNA da GCL por meio dessa via (Ha et al., 2006). Dessa forma, a concentração total de glutatona celular pode ser modulada pelo zinco.

Outro mecanismo de ação das NPZnO tem sido atribuído às metalotioneínas (MTs). No trabalho de Liang et al. foi observado um aumento da expressão de metalotioneína em ratos que foram suplementados com 5 mg/kg por dia de zinco (Liang et al., 2015). As MTs são proteínas ricas em cisteína, aminoácido fundamental na neutralização de EROs. A expressão de MTs é controlada pelo Fator de Transcrição de Metal 1 (MTF-1), uma proteína que contém seis domínios de *zinc fingers* e que, em condições basais, reside no citoplasma. Quando ocorre a dissolução das NPZnO e, conseqüentemente, o aumento de Zn^{2+} livre no citosol, esses íons saturam os *zinc fingers*, ativando o MTF-1, que se transporta para o núcleo e se liga aos Elementos de Resposta a Metais (MRE) no DNA, nas regiões promotoras dos genes MT (MT-1 e MT-2) (Chen et al., 2024; Sehshah et al., 2019). As cisteínas presentes nos MTs apresentam os grupos sulfidril (-SH), que são facilmente oxidados por radicais $\cdot\text{OH}$ e O_2^- , sequestrando essas EROs antes de danificarem os lipídios de membrana ou o DNA (Rice; Zweifach; Lynes, 2016). Assim, o sistema de metalotioneínas pode atuar como uma reserva antioxidante de ação rápida.

Metais de transição como ferro e cobre, apesar de essenciais, podem causar danos celulares quando presentes livres ou mal coordenados por catalisarem a Reação de Fenton, descrita anteriormente na subseção 2.2.1. Visto que o zinco possui geometrias de coordenação e afinidades de ligação semelhantes às desses metais, ele pode competir de forma eficaz pelos mesmos sítios de ligação nas membranas celulares, canais iônicos e proteínas do citoplasma (Oteiza, 2012). Ao ocupar esses sítios, o zinco desloca os íons de ferro e cobre ou impede sua ligação, inviabilizando

a ocorrência da reação de Fenton, pois não possui a capacidade de transferir elétrons para o H_2O_2 (Gaetke, 2003).

Por fim, o zinco é descrito como estruturalmente essencial para a atividade da SOD1, enzima chave na dismutação do ânion superóxido, atuando na estabilização da arquitetura quaternária da proteína (Gultekin et al., 2025). Sua deficiência pode induzir uma alteração conformacional na SOD1, chamada conformação *mutante-like*, que resulta na perda de função enzimática e desencadeia estresse no retículo endoplasmático devido ao acúmulo de proteínas mal dobradas (Homma et al., 2013). Em células do CCO, a suplementação exógena de zinco demonstrou elevar a atividade da SOD de maneira dose-dependente, confirmando que a biodisponibilidade desse íon é um fator limitante para a eficácia dessa defesa antioxidante enzimática (Anchordoquy et al., 2014).

2.4.3 Biocompatibilidade e toxicidade

A suplementação de NPZnO em sistemas biológicos exige precisão na concentração, pois o zinco pode apresentar comportamento antioxidante em doses fisiológicas e pró-oxidante em doses elevadas. Em oócitos bovinos, a suplementação com concentrações de 0,7 a 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPZnO durante a MIV reduziu significativamente os danos ao DNA nas células do *cumulus* e aumentou as concentrações de GSH, melhorando as taxas de blastocisto (Abdel-Halim; Moselhy; Helmy, 2018). Em estudo recente do nosso laboratório, Quintão et al. (2024) observaram que a suplementação com 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, também no meio MIV, resultou em um aumento significativo no número total de células dos blastocistos e uma redução significativa na produção de EROs após reaquecimento de embriões vitrificados, sem alterar as taxas de clivagem ou de produção de blastocistos (Quintão et al., 2024). Mais recentemente, Kandil et al. (2025) relataram que a suplementação com 10^{-6} M de NPZnO resultou em taxas de maturação nuclear e de blastocistos transferíveis significativamente superiores às obtidas com sulfato de zinco convencional ou grupo controle em modelos de búfalo e bovino (Kandil et al., 2025). No mesmo ano, Miglio et al. (2025) demonstraram que a funcionalização de NPZnO com curcumina (6 e 12 μM) durante a MIV reduziu a produção de EROs e aumentou a taxa de blastocistos (Miglio et al., 2025).

Contudo, a toxicidade das NPZnO se manifesta quando a doses fisiológicas são excedidas, afetando a viabilidade, a expressão gênica e a integridade estrutural. Camaioni et al. (2021) demonstraram que NPZnO não revestidas, em concentrações de 10 µg/mL, induziram toxicidade severa em CCOs de camundongos (Camaioni et al., 2021). Em células da granulosa suína, Wang et al. (2024) reportaram que a exposição a 4 µg/mL de NPZnO reduziu a viabilidade celular e suprimiu a secreção de estradiol e progesterona (Wang et al., 2024). Em espermatozoides humanos, Barkhordari et al. (2013) observaram que a citotoxicidade é dependente da dose e do tempo, com taxas máximas de morte celular em concentrações de 100 a 1000 µg/mL (Barkhordari et al., 2013).

Portanto, a literatura evidencia que a aplicação de NPZnO em sistemas reprodutivos apresenta caráter dose-dependente, em que o potencial para o controle do estresse oxidativo e a melhoria da qualidade oocitária e embrionária depende de janelas terapêuticas precisas, capazes de promover a homeostase celular sem desencadear processos citotóxicos.

3 HIPÓTESE

A suplementação com NPZnO durante a maturação *in vitro* modula a qualidade oocitária e o desenvolvimento embrionário bovino de forma dependente da concentração.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da suplementação com nanopartículas de óxido de zinco durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, investigando seus impactos sobre a qualidade oocitária e embrionária.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as NPZnO quanto às suas propriedades físicas, químicas e morfológicas;
- Avaliar os efeitos da suplementação com NPZnO durante a MIV de oócitos bovinos nas taxas de maturação nuclear, atividade mitocondrial e espécies reativas de oxigênio em oócitos;
- Investigar a influência da NPZnO na MIV em relação à peroxidação lipídica, atividade mitocondrial, número total de células e apoptose de blastocistos bovinos;

5 MATERIAL E MÉTODOS

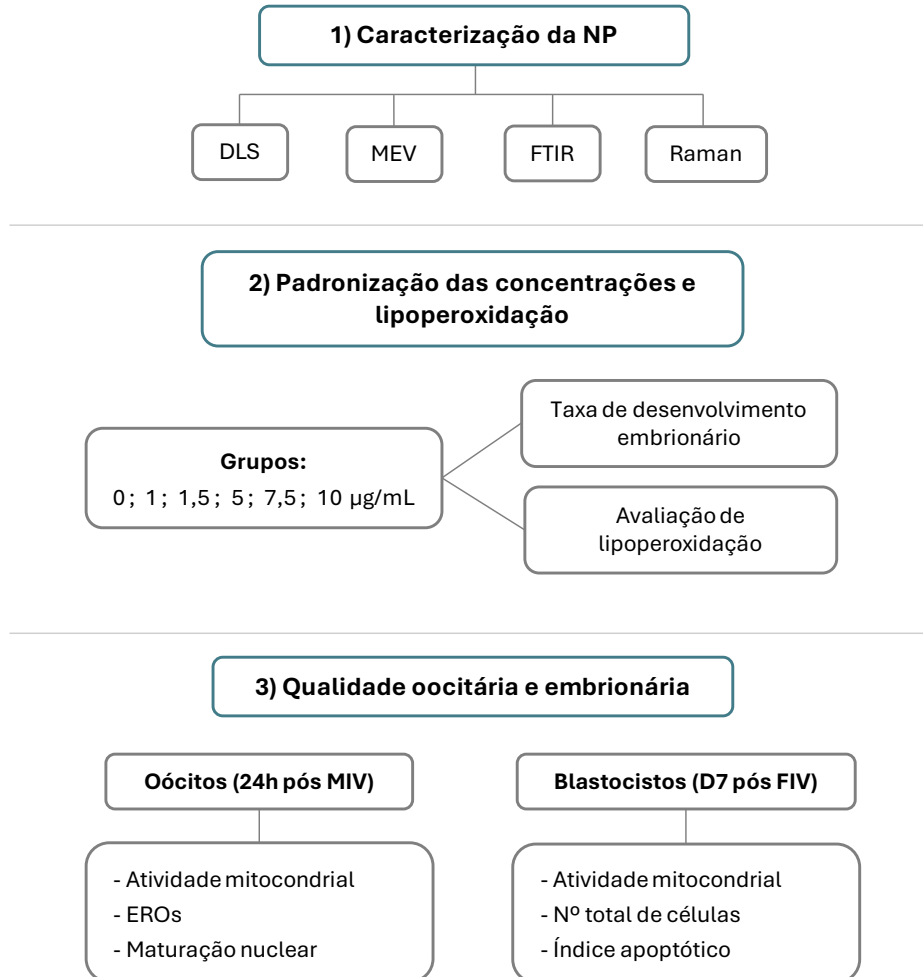
O experimento foi conduzido em três etapas utilizando NPZnO adquiridas comercialmente (Sigma-Aldrich-677450).

Na primeira etapa, foi realizada a caracterização físico-química e morfológica das nanopartículas através dos ensaios de Espalhamento de Luz Dinâmico (*Dynamic Light Scattering* - DLS), análises espectroscópicas por Infravermelho (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* - FTIR) e Raman e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Na segunda etapa, foi realizado um estudo de padronização de concentrações, no qual oócitos foram maturados em diferentes concentrações de NPZnO (0; 1,0; 1,5; 5,0; 7,5 e 10 µg/mL), seguidos de fecundação e cultivo *in vitro*. Posteriormente, foram avaliadas as taxas de desenvolvimento embrionário e lipoperoxidação. Com base nesses resultados, foram definidos três grupos experimentais que foram utilizados nos ensaios biológicos subsequentes (0; 1,5; 7,5 µg/mL).

Na terceira etapa, foram conduzidos estudos para avaliação da qualidade de oócitos e blastocistos, incluindo maturação nuclear, atividade mitocondrial e níveis de EROs (oócitos), atividade mitocondrial, número total de células e apoptose (blastocistos).

Figura 2 - Representação esquemática do delineamento experimental



5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

5.1.1 Espalhamento de luz dinâmico

As NPZnOs foram caracterizadas quanto ao tamanho hidrodinâmico e índice de polidispersão através da técnica de DLS e potencial zeta pelo método de mobilidade eletroforética, utilizando o equipamento Zetasizer® Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido). Para as análises, as nanopartículas foram dispersas em meio MIV completo nas concentrações 1, 1,5, 5 e 7,5 µg/mL, utilizando um sonicador de ponta Hielscher UP200S (Hielscher Ultrasonics, Teltow,

Alemanha) por 1 minuto, com amplitude de 100% e ciclo contínuo. Cada amostra foi analisada em triplicata e os dados foram obtidos através do software Malvern Zetasizer 8.02.

5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As NPZnO foram dispersas em isopropanol e gotejadas sobre um substrato de silício. Após a secagem, o substrato foi fixado no porta amostras e submetido à um recobrimento com uma camada de platina de 4 nm, utilizando um Sputter Coater ACE 600 (LEICA Microsystems). As análises foram feitas no Microscópio MEV-FEG JSM6701F (JEOL Ltd., Tóquio, Japão), com tensão de aceleração de 5 KV e distância de trabalho de 3 mm.

5.1.3 Espectroscopia Raman e Infravermelho

Os espectros Raman e Infravermelho foram obtidos no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, utilizando amostras puras de NPZnO. A espectroscopia Raman foi realizada através do espectrômetro FT-Raman Bruker Multiram (Bruker Corporation, Massachusetts, EUA), com laser Nd:YAG operando em comprimento de onda de 1064 nm, resolução espectral de 4 cm^{-1} , com faixa espectral variando de 4000 a 50 cm^{-1} , potência de laser de 200 mW e acúmulo de 1024 varreduras. A espectroscopia na região do infravermelho foi realizada em um equipamento interferométrico Bruker Vertex 70v (Bruker Corporation, Massachusetts, EUA) acoplado com diamante de platina ATR. Os espectros foram adquiridos na faixa espectral de 400 a 4000 cm^{-1} , com 215 varreduras.

5.2 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

5.2.1 Obtenção e seleção de oócitos

Foram utilizados oócitos provenientes de ovários bovinos obtidos de abatedouro. Os ovários foram transportados ao laboratório em garrafa térmica

contendo solução fisiológica (NaCl 0,9%) aquecida em torno de 37°C. Após a chegada ao laboratório, os ovários foram lavados com solução fisiológica aquecida e, em seguida, folículos com diâmetro entre 3 e 8 mm foram aspirados com o auxílio de agulha (21G) acoplada a seringa de 20 mL. O fluido folicular foi transferido para tubos de fundo cônico (50 mL), previamente aquecidos, onde permaneceram em banho-maria até a sedimentação.

5.2.2 Maturação, fecundação e cultivo *in vitro*

Para a MIV, foram selecionados oócitos com citoplasma homogêneo e com cerca de 2 a 3 camadas de células do *cumulus*. Após a seleção, os oócitos foram lavados duas vezes em meio Talp-HEPES suplementado com BSA, piruvato de sódio e antibióticos (meio de lavagem) e uma vez em meio de maturação (TCM-199 suplementado com 10% de SFB, hormônios, antibióticos, piruvato de sódio) e NPZnO, de acordo com cada tratamento. Em seguida, os oócitos foram transferidos para microgotas de 100µL (20-25 oócitos/gota) contendo meio MIV completo suplementado com as NPZnO nas diferentes concentrações, cobertas por óleo mineral. A maturação *in vitro* foi realizada em estufa a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

Após 24 horas de MIV, oócitos de todos os grupos foram fecundados em meio Fert-TALP com 2×10^6 espermatozoides, por cerca de 20 horas. Em seguida, os prováveis zigotos foram cultivados em meio SOF suplementado com 1,5% de SFB e 6 mg/mL de BSA livre de ácidos graxos. Todas as estruturas foram mantidas em estufa a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ e 20% O₂ durante 7 dias até atingirem o estágio de blastocisto (dia 0 = dia da fecundação). Foram cultivados entre 10 a 20 zigotos por microgota de 100 µL, em placas de poliestireno de 35 mm recobertas com óleo mineral. No quarto dia do desenvolvimento, foi realizada a renovação parcial do meio, com remoção de 50% do volume da gota e reposição de igual volume do meio novo. As taxas de clivagem e de produção de blastocistos foram avaliadas após 48h e 7 dias da FIV, respectivamente.

Para a análise das taxas de clivagem e blastocisto, foram realizadas 4 a 7 baterias independentes por grupo. O N correspondeu ao número de zigotos presumíveis. Foram utilizados aproximadamente 40 oócitos por grupo, em média, com variação conforme a disponibilidade do dia.

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.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE LIPOPEROXIDAÇÃO EM EMBRIÕES

No D7, os blastocistos foram incubados com a sonda Bodipy 581/591 C11 (D3861; Invitrogen, EUA) na concentração final de 5 μ M (1 μ L da sonda na concentração de 500 μ M em cada gota de cultivo). Após a incubação por 30 minutos, os embriões foram transferidos para lâminas com um volume mínimo de meio de cultivo. Foram realizadas 3 repetições independentes. O N correspondeu ao número de embriões analisados, sendo controle (N = 70), 1,0 μ g/mL (N = 37), 1,5 μ g/mL (N = 62) e 5,0 μ g/mL (N = 49). As imagens referentes à distribuição dos lipídios oxidados e não oxidados foram capturadas utilizando microscópio de fluorescência invertido (EVOSM5000, Thermo Fisher Scientific, EUA), com a objetiva de 20x e filtros apropriados para a emissão da sonda Bodipy 581/591 C11. A intensidade da fluorescência de cada embrião foi analisada no software ImageJ versão 1.53 (National Institutes of Health, Maryland, EUA). A taxa de fluorescência foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Peroxidação lipídica (\%)} = \frac{\text{Valor da fluorescência verde}}{\text{Valor da fluorescência verde} + \text{vermelho}} * 100$$

5.4 AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR, ATIVIDADE MITOCONDRIAL E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM OÓCITOS

A maturação nuclear foi avaliada pela progressão meiótica até metáfase II (MII) com a extrusão do primeiro corpúsculo polar. Adicionalmente, foram avaliados os níveis de EROs e atividade mitocondrial em oócitos após a MIV. Inicialmente, as células do *cumulus* foram removidas dos CCOs por meio de pipetagens sucessivas em solução de hialuronidase a 0,2% em PBS. Os oócitos maturados *in vitro* foram incubados por 60 minutos a 37°C em meio MIV contendo 0,5 μ M de Mitotracker Red

CMXRos (Thermo-Fisher Scientific) (1:100) para análise da atividade mitocondrial. Após 30 minutos de incubação, foi adicionado 5 μ M de CellROX Green (Thermo-Fisher Scientific) (1:100) para avaliação de EROs. Após a incubação, os oócitos de cada grupo experimental foram lavados em 3 gotas de PBS suplementado com 1% de BSA e submetidos a fixação em paraformaldeído 4% (v/v).

Para a avaliação nuclear, as estruturas foram montadas individualmente em pequenas gotas de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) com ProLong™ Gold Antifade Mountant (Thermo-Fisher Scientific) em lâminas de microscopia. As imagens dos oócitos corados foram obtidas utilizando microscópio de fluorescência (EVOS M5000, Thermo Fisher Scientific, EUA), com uma objetiva de 20x, nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 579/599, 485/520 e 360/460 nm para Mitotracker Red, CellROX Green e DAPI, respectivamente.

O ensaio foi realizado em 3 repetições independentes. Para a análise da atividade mitocondrial, foram consideradas as 3 repetições (N = 112/102/104); para os níveis de EROs, foram consideradas 2 repetições (N = 45/73/62); e para a maturação nuclear, foram consideradas as 3 repetições (N = 58/91/100), para controle, 1,5 e 7,5 μ g/mL, respectivamente.

Para a quantificação da fluorescência relativa à atividade mitocondrial e aos níveis de EROs, as imagens foram analisadas no *software* ImageJ versão 1.53 (National Institutes of Health, Maryland, EUA). Foram obtidos os valores de densidade integrada (*intden*), área do oócito e a média de fluorescência (*mean*) de três regiões de fundo (*background*) para o cálculo da Fluorescência Celular Total Corrigida (CTCF).

$$\text{CTCF} = \text{Densidade Integrada} - (\text{Área} * \text{Média da fluorescência do fundo})$$

5.5 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL, NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS E ÍNDICE APOPTÓTICO EM EMBRIÕES

A atividade mitocondrial dos blastocistos foi avaliada utilizando a sonda fluorogênica Mitotracker Red CMXRos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Blastocistos de cada grupo experimental foram corados diretamente nas próprias gotas de cultivo, protegidos da luz, com 10 μ M de Mitotracker Red a 38,5°C, por 30

minutos. Após a incubação, os embriões foram lavados em solução de PBS suplementado com 1% de BSA e fixados em paraformaldeído 4% (em PBS) por 30 minutos à temperatura ambiente, até a realização do ensaio de detecção de apoptose, utilizando o kit DeadEnd Fluorometric TUNEL system (Promega, EUA).

Para o ensaio de TUNEL, os embriões foram permeabilizados com Triton X-100 a 0,2% por 5 minutos, lavados em PBS e mantidos em tampão por 5-10 minutos. Foram preparados os controles negativos (ausência da enzima rTdT) e positivos (Dnase 10 U/mL). Os embriões dos grupos experimentais foram incubados em tampão de reação contendo nucleotídeos fluorescentes e enzima rTdT por 1 hora. Após a incubação, os embriões foram transferidos para uma solução de lavagem (*Saline-sodium citrate* [SSC]) e corados com solução de Hoechst 33342 (10 µg/mL), onde permaneceram por 30 minutos. Em seguida, os embriões foram montados em lâminas cobertas por lamínulas e examinados em um microscópio invertido EVOS M5000 (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Os embriões de cada unidade experimental foram avaliados quanto ao número total de células (Hoechst 33342), à atividade mitocondrial (Mitotracker Red) e ao índice apoptótico (TUNEL), por meio de colorações sequenciais com três fluoróforos distintos. O ensaio foi realizado em 3 repetições independentes, com N = 28/26/18 para atividade mitocondrial, 22/20/17 para número total de células e 21/20/14 para apoptose, sendo controle, 1,5 e 7,5 µg/mL, respectivamente. As imagens foram obtidas individualmente, utilizando filtros específicos para cada faixa de excitação e emissão. As intensidades médias de fluorescência (média de pixels) e o número total de células foram obtidos com auxílio do software ImageJ versão 1.53 (National Institutes of Health, Maryland, EUA).

5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As proporções de embriões clivados e blastocistos produzidos foram avaliadas pelo teste de Qui-quadrado (χ^2). A normalidade das variáveis foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk.

Para os blastocistos, as variáveis relacionadas à lipoperoxidação, atividade mitocondrial, número total de células e índice apoptótico foram submetidas à análise

de variância (ANOVA *one-way*), seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas entre os grupos.

Nos oócitos, os dados referentes à atividade mitocondrial e aos níveis de EROs foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, utilizando-se o pós-teste de Dunn para comparações entre os grupos. A taxa de maturação nuclear foi avaliada por meio de regressão logística. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism (versão 9.3.0), adotando-se nível de significância de 5%.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

6.1.1 Espalhamento de luz dinâmico

As NPZnO dispersas em meio MIV apresentaram tamanho hidrodinâmico médio variando entre aproximadamente 42 e 54 nm, com discreto aumento nas maiores concentrações avaliadas (Tabela 1). Os valores de PDI permaneceram acima de 0,5 em todas as condições, indicando uma distribuição de tamanhos relativamente heterogênea (Danaei et al., 2018). O potencial Zeta manteve-se negativo e próximo a -10 mV em todas as concentrações, sugerindo comportamento eletrocinético semelhante entre os grupos testados.

Tabela 1 – Tamanho hidrodinâmico, PDI e potencial zeta de NPZnO dispersas em meio MIV obtidos por DLS

Concentração (µg/mL)	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
1,0	42,6 ± 0,3	0,616 ± 0,11	-9,88 ± 0,8
1,5	43,6 ± 1,9	0,762 ± 0,18	-8,12 ± 0,9
5,0	54,4 ± 3,9	0,593 ± 0,13	-9,15 ± 0,9
7,5	49,3 ± 1,4	0,575 ± 0,04	-10,23 ± 0,2

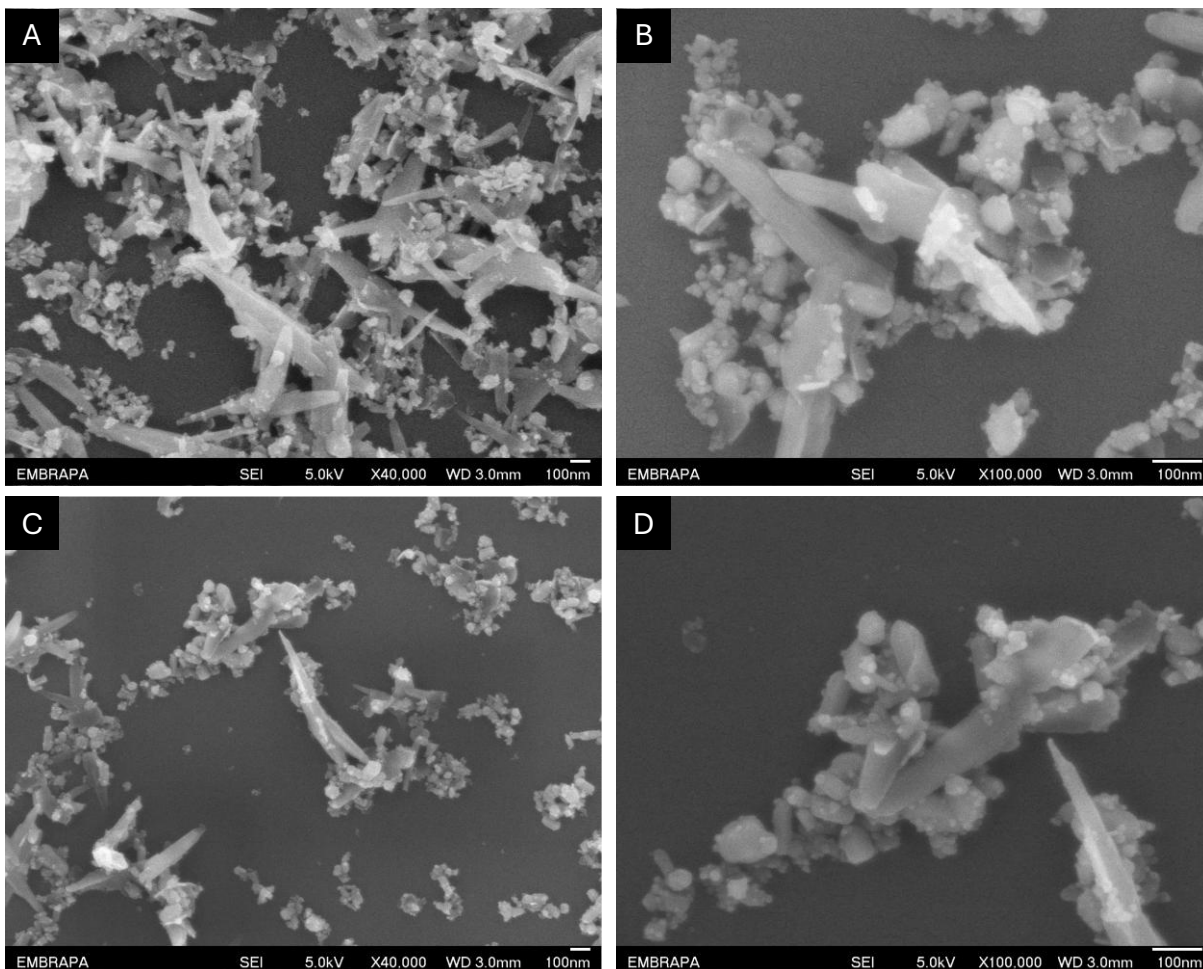
PDI: Índice de polidispersão. Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n = 3).

6.1.2 Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias obtidas por MEV (Figura 3) evidenciaram a presença de partículas predominantemente nanométricas, organizadas em aglomerados irregulares. Nas imagens com menor ampliação (40.000x), observou-se a formação de agregados constituídos por partículas de diferentes dimensões, enquanto nas imagens com maior ampliação (100.000x) foi possível visualizar partículas individuais

com contornos predominantemente arredondados, bem como estruturas com morfologia alongada. Adicionalmente, foram observadas partículas com dimensões superiores a 100 nm, indicando heterogeneidade morfológica e dimensional da amostra.

Figura 3 - Imagens de NPZnO por microscopia eletrônica de varredura em diferentes escalas



Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das NPZnO. A e B correspondem ao mesmo campo de visão, em 40.000x e 100.000x, respectivamente; o mesmo se aplica a C e D (40.000x e 100.000x). Barra de escala: 100 nm.

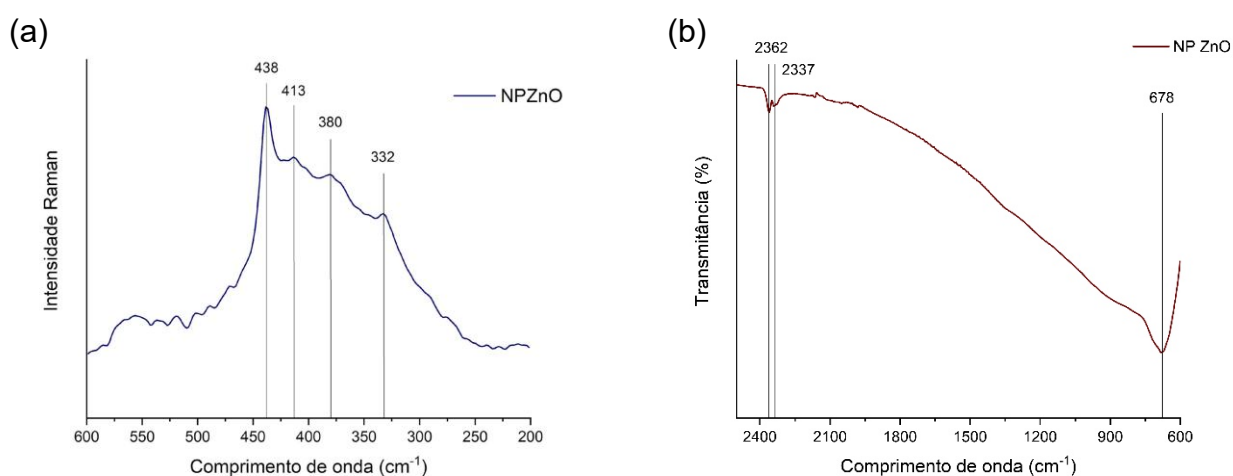
6.1.3 Espectroscopias Raman e Infravermelho

A espectroscopia Raman da amostra de NPZnO revelou a presença de bandas características da estrutura do óxido de zinco. Foram identificados picos em 332 cm^{-1} , 380 cm^{-1} , 413 cm^{-1} e 438 cm^{-1} (Figura 2a), compatíveis com os modos vibracionais

descritos para a estrutura cristalina do ZnO. O pico observado em 332 cm^{-1} foi atribuído a processos de fônons de segunda ordem, especificamente ao modo $E_2(M)$, resultante da combinação dos modos $E_2(\text{high})$ e $E_2(\text{low})$ da estrutura wurtzita do ZnO (THIRUVENGADATHAN et al., 2022). O pico em 380 cm^{-1} corresponde ao modo $A_1(\text{TO})$, relacionado aos fônons ópticos transversais da rede cristalina. Em 413 cm^{-1} , foi identificado o modo $E_1(\text{TO})$, também característico da rede cristalina do óxido de zinco (SINGAMANENI et al., 2009). O pico mais intenso, observado em 438 cm^{-1} , foi atribuído ao modo $E_2(\text{high})$, considerado o principal modo Raman ativo do ZnO em fase wurtzita, diretamente relacionado às vibrações dos átomos de oxigênio na rede cristalina (JIN et al., 2009; SHARMA et al., 2012). Em conjunto, esses resultados indicam a identidade estrutural esperada para o material analisado.

A espectroscopia no infravermelho foi empregada para identificar bandas vibracionais características, verificar a presença de ligações Zn–O e possíveis interações com o meio. Foram identificados três picos principais em 678 cm^{-1} , 2337 cm^{-1} e 2362 cm^{-1} (Figura 2b). O pico em 678 cm^{-1} foi atribuído ao modo de estiramento das ligações Zn–O, característico da estrutura do óxido de zinco (SINGH; SHARMA; KIM, 2020). Os picos em 2337 cm^{-1} e 2362 cm^{-1} estão associados à absorção de CO_2 atmosférico, atribuída à vibração assimétrica do grupo C=O, um fenômeno comumente observado em análises espectroscópicas devido à interação da amostra com o ambiente.

Figura 4 - Espectros Raman (a) e Infravermelho por Transformada de Fourier (b) da amostra de NPZnO



6.2 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM NPZnO NAS TAXAS DE CLIVAGEM E BLASTOCISTOS

As taxas de clivagem e produção de blastocistos obtidas após a suplementação do meio de MIV com diferentes concentrações de NPZnO estão apresentadas na tabela 2. Observou-se que ambos os parâmetros foram influenciados de maneira dependente da concentração utilizada, com respostas distintas entre os grupos experimentais.

Em relação à taxa de clivagem, os maiores percentuais foram observados nos grupos suplementados com 1,0 e 1,5 µg/mL, não havendo diferença estatística em relação ao grupo controle ($p > 0,05$). Entretanto, houve uma redução significativa nesse parâmetro a partir da concentração de 5,0 µg/mL, com o menor valor registrado no grupo tratado com 10,0 µg/mL.

Quanto à produção de blastocistos, a suplementação com 1,5 µg/mL apresentou o maior percentual de desenvolvimento embrionário (60,5%), sendo estatisticamente superior aos grupos controle, 5,0, 7,5 e 10,0 µg/mL ($p < 0,05$), mas não diferindo da concentração de 1,0 µg/mL. Em contrapartida, as concentrações de 7,5 e 10,0 µg/mL promoveram uma redução significativa na formação de blastocistos, com percentuais de 24,3% e 1,3% respectivamente ($p < 0,05$).

Diante desse perfil dose-resposta, foram selecionadas as concentrações 1,5 e 7,5 µg/mL, além do grupo controle, para a investigação dos efeitos biológicos em etapas subsequentes.

Tabela 2 - Desenvolvimento pós-fecundação de oócitos maturados sob diferentes concentrações de NPZnO.

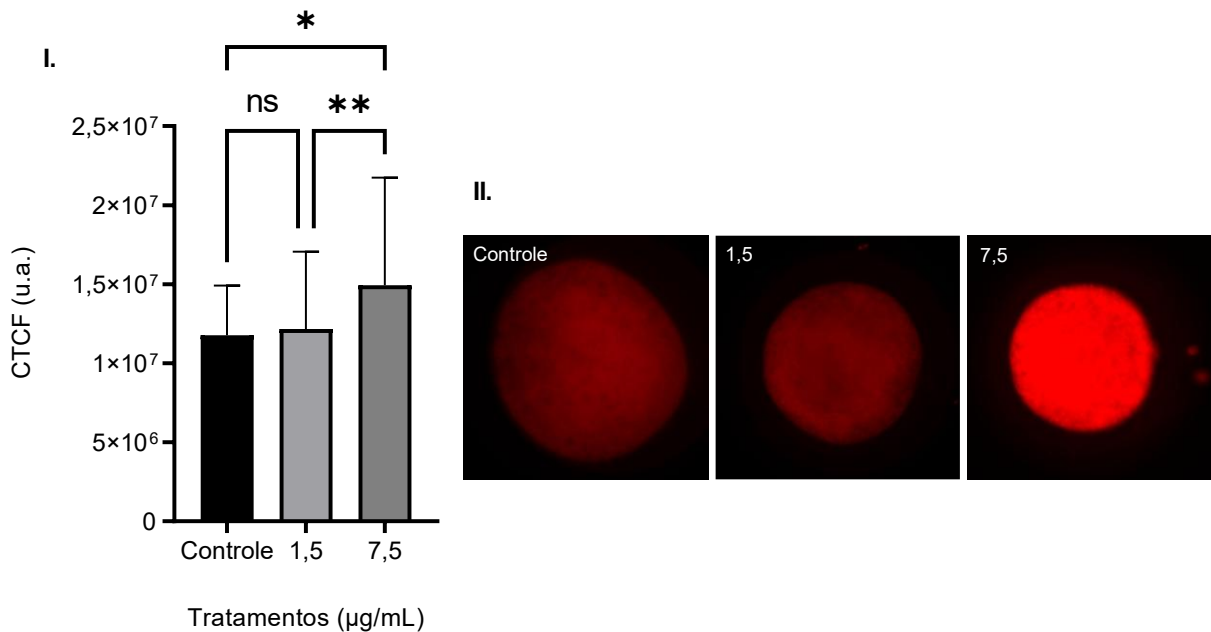
Grupos ($\mu\text{g/mL}$)	Clivagem <i>n</i> (%)	Blastocisto <i>n</i> (%)
Controle	254/307 (82,7) ^{ab}	159/307 (51,8) ^a
1,0	191/217 (88,0) ^a	120/217 (55,3) ^{ab}
1,5	268/314 (85,4) ^{ab}	190/314 (60,5) ^b
5,0	184/234 (78,6) ^b	120/234 (51,3) ^a
7,5	156/226 (69,0) ^c	55/226 (24,3) ^c
10,0	2/150 (1,3) ^d	2/150 (1,3) ^d

Os valores são expressos como número de estruturas clivadas/total de oócitos (%) na coluna de clivagem e número de embriões blastocistos/total de oócitos (%) na coluna de blastocisto para cada grupo experimental. Letras diferentes dentro da mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$).

6.3 EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NPZnO NA ATIVIDADE MITOCONDRIAL, NÍVEL DE EROs E MATURAÇÃO NUCLEAR DE OÓCITOS BOVINOS

A atividade mitocondrial nos oócitos, avaliada por meio da fluorescência celular total corrigida, está apresentada na Figura 5. Observou-se um efeito dependente da concentração de NPZnO, não houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo suplementado com 1,5 $\mu\text{g/mL}$ de NPZnO ($p > 0,05$). Em contrapartida, a suplementação de 7,5 $\mu\text{g/mL}$ promoveu um aumento significativo na atividade mitocondrial em comparação ao grupo controle e ao grupo tratado com 1,5 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$). As micrografias representativas corroboram esse aumento de fluorescência no grupo 7,5 $\mu\text{g/mL}$.

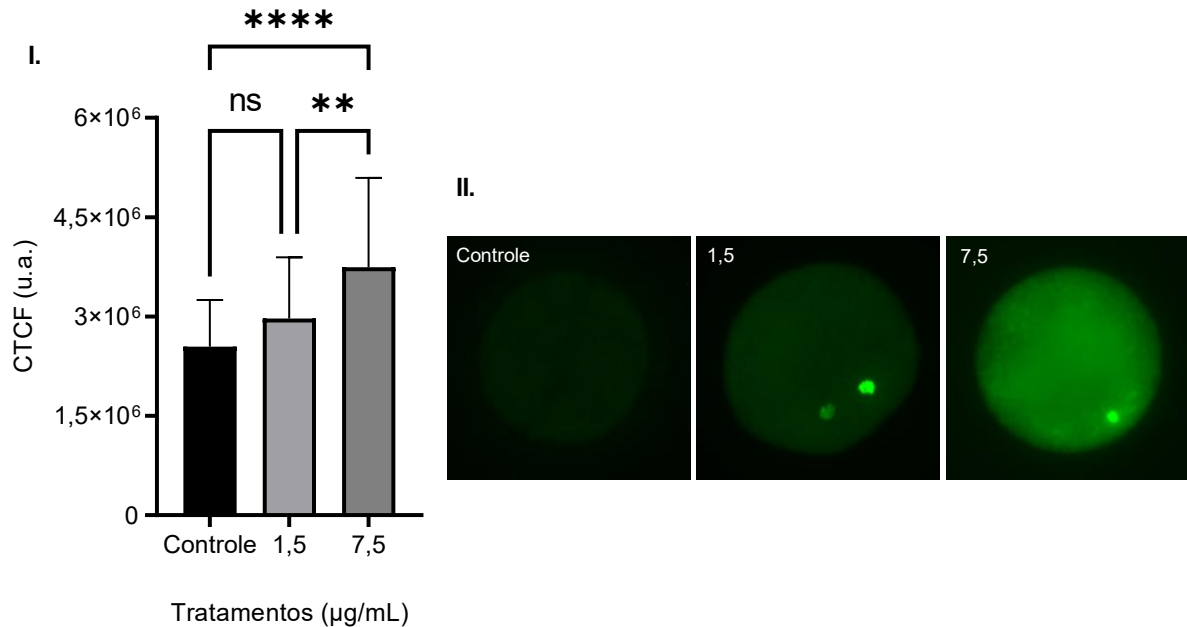
Figura 5 – Efeito das NPZnO na atividade mitocondrial de oócitos bovinos maturados *in vitro*



(I) Gráfico representativo da Fluorescência Celular Total Corrigida (unidades arbitrárias [u.a]) nos grupos controle, 1,5 e 7,5 µg/mL. As barras representam a média ± desvio padrão. Asteriscos (* e **) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$), enquanto "ns" indica ausência de diferença significativa. (II) Micrografias de fluorescência representativas de cada grupo experimental, evidenciando a atividade mitocondrial, através das intensidades de fluorescência da sonda Mitotracker Red CMXRos, após exposição dos oócitos bovinos aos diferentes tratamentos. As imagens foram capturadas com uma objetiva de 20x.

Quanto aos níveis de EROs nos oócitos (Figura 6), os resultados revelaram que não houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo suplementado com 1,5 µg/mL de NPZnO ($p > 0,05$). No entanto, a suplementação com 7,5 µg/mL resultou em níveis de EROs significativamente superiores quando comparadas ao grupo controle e ao grupo tratado com 1,5 µg/mL ($p < 0,05$), o que também é visualmente evidenciado pelas micrografias de fluorescência.

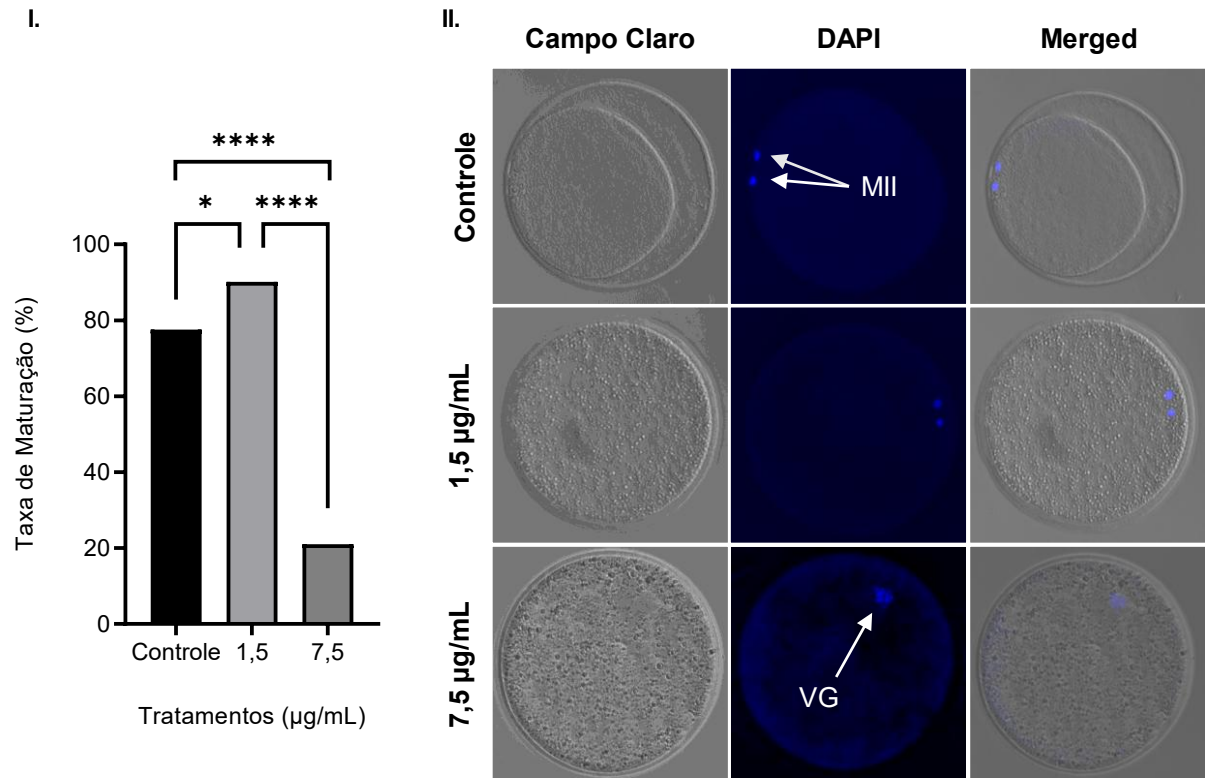
Figura 6 – Efeitos das NPZnO nos níveis de EROs em oócitos bovinos maturados *in vitro*



(I) Gráfico representativo da Fluorescência Celular Total Corrigida (u.a.) nos grupos controle, 1,5 e 7,5 µg/mL. As barras representam a média ± desvio padrão. Asteriscos (** e ****) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$), enquanto "ns" indica ausência de diferença significativa. (II) Micrografias de fluorescência representativas de cada grupo experimental obtidas pela sonda CellROX Green, evidenciando a produção de espécies reativas de oxigênio. As imagens foram capturadas com uma objetiva de 20x.

Por fim, em relação à taxa de maturação nuclear (Figura 7), verificou-se um efeito bifásico da suplementação. A concentração de 1,5 µg/mL de NPZnO promoveu um aumento significativo na proporção de oócitos que atingiram o estágio de metáfase II em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). Em contrapartida, a dose de 7,5 µg/mL resultou em uma redução significativa da maturação nuclear, apresentando valores significativamente inferiores aos observados tanto no grupo controle, quanto no grupo suplementado com 1,5 µg/mL ($p < 0,05$) (Figura 7), evidenciada pela maior proporção de oócitos em vesícula germinativa.

Figura 7 – Efeitos das NPZnO na maturação nuclear de oócitos bovinos maturados *in vitro*



(I) Gráfico representativo da taxa de maturação (%) nos grupos controle, 1,5 e 7,5 µg/mL. Asteriscos (* e ****) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$). (II) Micrografias representativas de cada grupo experimental obtidas em campo claro, fluorescência (DAPI; azul) e sobreposição (*merged*), evidenciando oócitos em metáfase II (MII) e vesícula germinativa (VG). As imagens foram capturadas com uma objetiva de 20x.

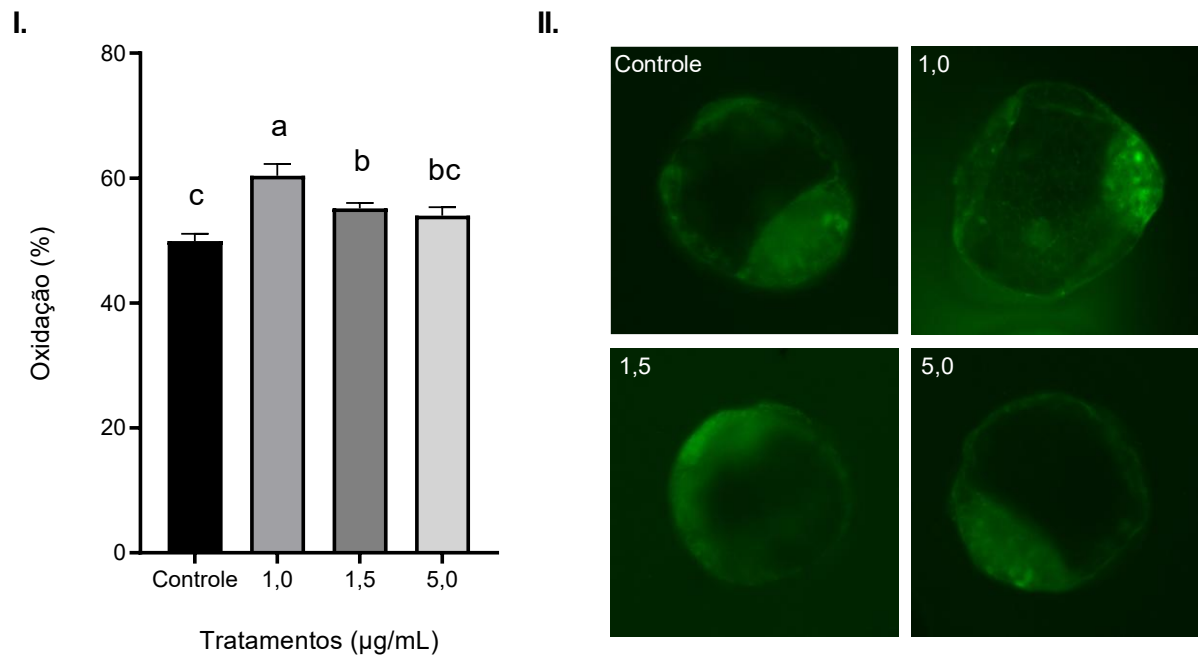
6.4 QUANTIFICAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO EM EMBRIÕES

Os níveis de lipoperoxidação nos blastocistos produzidos na etapa de padronização das concentrações de NPZnO estão apresentados na Figura 8. Observou-se um efeito dependente da concentração com diferenças significativas entre os grupos experimentais.

A suplementação com 1,0 µg/mL de NPZnO resultou no maior índice de lipoperoxidação (60,4%), sendo este valor estatisticamente superior aos observados nos demais grupos experimentais ($p < 0,05$). No grupo suplementado com 1,5 µg/mL, observou-se uma média de lipoperoxidação de 55,1%, valor superior ao do grupo controle (49,9%), o qual registrou o menor percentual de lipoperoxidação entre os

grupos experimentais. O tratamento com 5,0 $\mu\text{g/mL}$ apresentou uma média de lipoperoxidação de 54%, não diferindo estatisticamente em relação dos grupos controle e 1,5 $\mu\text{g/mL}$ ($p > 0,05$).

Figura 8 - Efeito das diferentes concentrações de NPZnO na lipoperoxidação de blastocistos bovinos produzidos in vitro



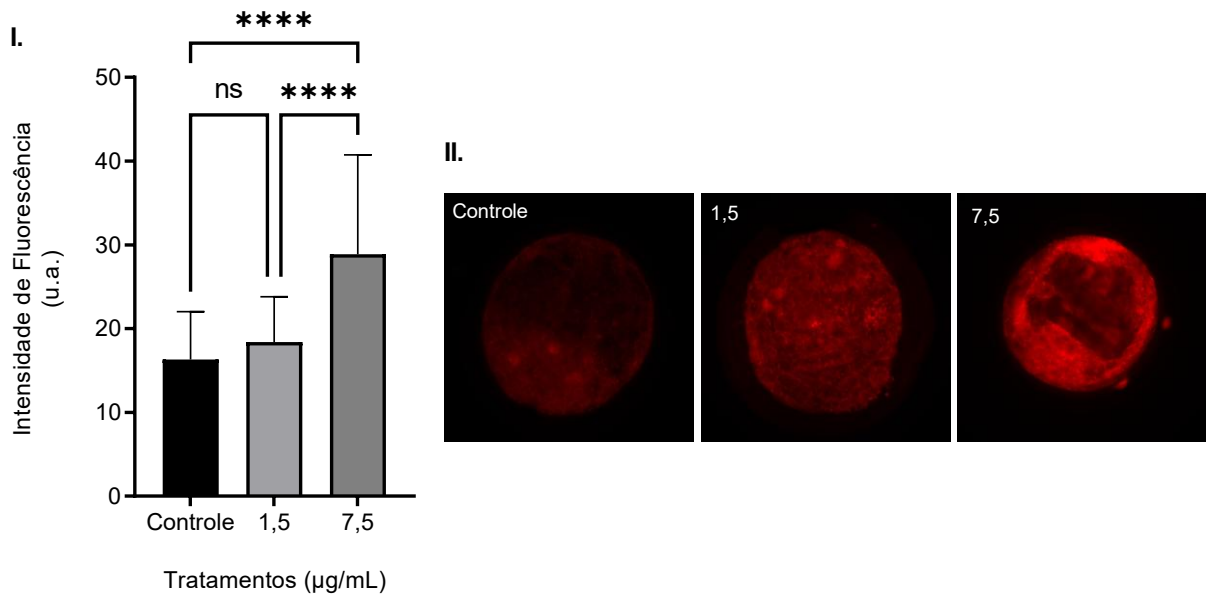
(I) Gráfico representativo da porcentagem de oxidação nos grupos controle, 1,0, 1,5 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$. As barras representam a média \pm erro padrão da média. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$). (II) Micrografias de fluorescência representativas de cada grupo experimental, evidenciando a marcação da oxidação de lipídios intracelular. As imagens foram capturadas com uma objetiva de 20x.

6.5 EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NPZnO NA ATIVIDADE MITOCONDRIAL, NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS E ÍNDICE APOPTÓTICO EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Em relação à atividade mitocondrial, os resultados obtidos através da análise da intensidade de fluorescência nos blastocistos (Figura 9) indicaram ausência de diferença significativa entre o grupo controle e o grupo suplementado com 1,5 $\mu\text{g/mL}$

de NPZnO ($p > 0,05$). Entretanto, a suplementação com a concentração de 7,5 $\mu\text{g/mL}$ resultou em uma atividade mitocondrial significativamente superior em comparação ao grupo controle e ao grupo tratado com 1,5 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,0001$), o que também é evidenciado pelas micrografias de fluorescência.

Figura 9 – Efeito das diferentes concentrações de NPZnO na atividade mitocondrial de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*



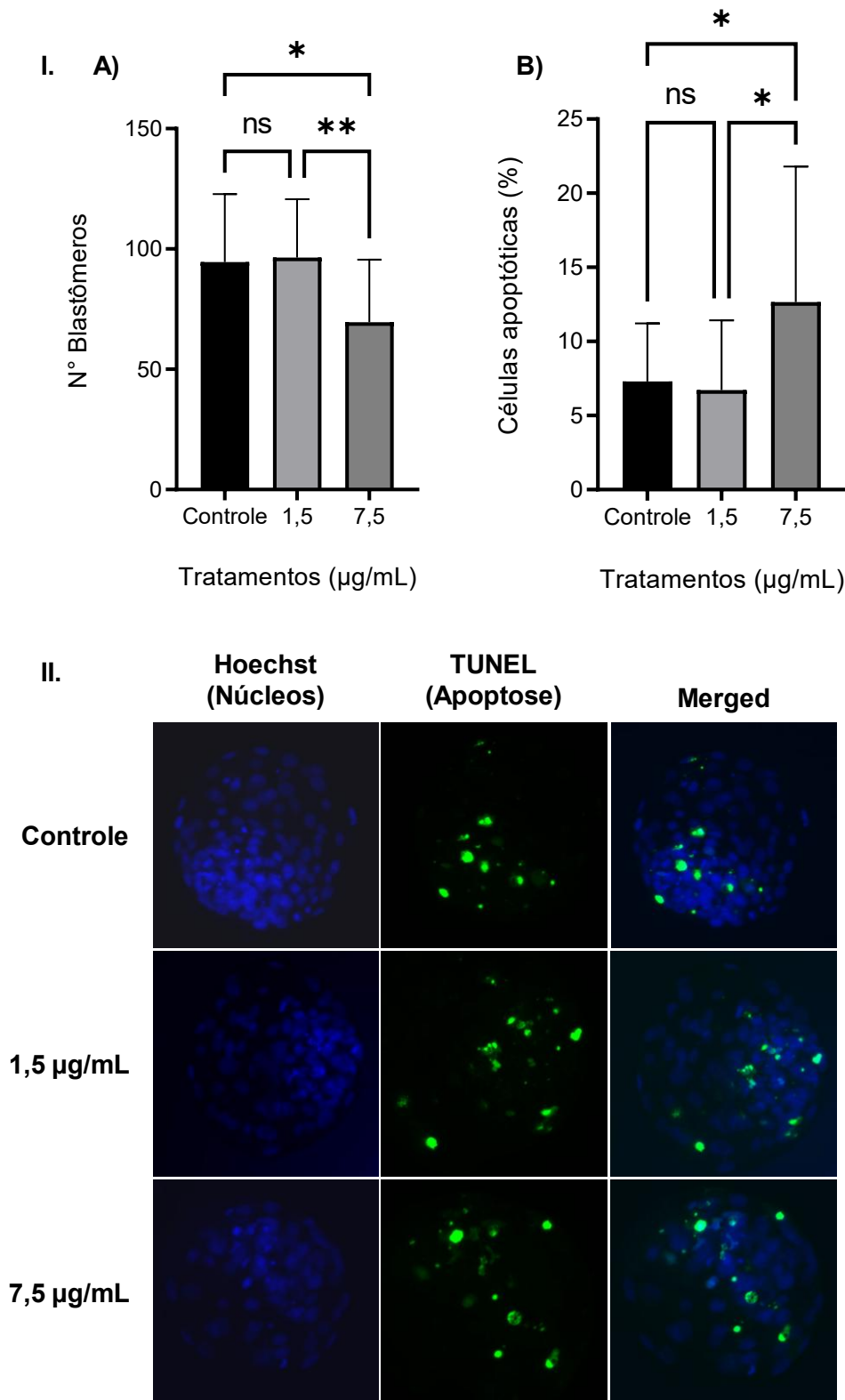
(I) Gráfico representativo da intensidade de fluorescência (u.a.) nos grupos controle, 1,5 e 7,5 $\mu\text{g/mL}$. As barras representam a média \pm desvio padrão. Asteriscos (****) indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$), enquanto "ns" indica ausência de diferença significativa. (II) Micrografias de fluorescência representativas de cada grupo experimental, evidenciando as intensidades de fluorescência da sonda Mitotracker Red CMXRos. As imagens foram capturadas com uma objetiva de 20x.

Em relação ao número total de células (Figura 10), os resultados demonstraram que não houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo suplementado com 1,5 $\mu\text{g/mL}$ de NPZnO ($p > 0,05$). Contudo, a suplementação de 7,5 $\mu\text{g/mL}$ reduziu significativamente o número médio de blastômeros por embrião quando comparadas aos grupos controle e 1,5 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) (Figura 10).

Quanto ao índice apoptótico (Figura 10), observou-se um perfil semelhante ao do número total de células. Não houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo suplementado com 1,5 $\mu\text{g/mL}$ de NPZnO ($p > 0,05$). No entanto, a concentração de 7,5 $\mu\text{g/mL}$ promoveu um aumento significativo na porcentagem de células

apoptóticas em comparação aos grupos controle e 1,5 µg/mL ($p < 0,05$), conforme evidenciado pelo ensaio de TUNEL.

Figura 10 - Efeito das NPZnO no número total de blastômeros e na taxa de apoptose de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*



(I) Gráficos representativos do número total de blastômeros (A) e índices apoptóticos (B) nos grupos controle, 1,5 e 7,5 µg/mL. As barras representam a média ± desvio padrão. Asteriscos (* e **) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$), enquanto

"ns" indica ausência de diferença significativa. (II) Micrografias de fluorescência representativas de cada grupo experimental obtidas pelo ensaio de TUNEL, evidenciando os núcleos (Hoechst 33342; azul) e as células em apoptose (TUNEL; verde). As imagens foram capturadas com uma objetiva de 20x.

7 DISCUSSÃO

O ambiente *in vitro* subótimo compromete a competência oocitária e a qualidade embrionária, principalmente, em decorrência da degradação celular induzida pelo aumento da formação de EROs (Soto-Heras; Paramio, 2020). Embora o zinco seja reconhecido como um regulador essencial da homeostase redox e da maturação oocitária (Anchordoquy et al., 2014; Kim et al., 2011), a utilização de NPZnO surge como uma abordagem promissora para aumentar a biodisponibilidade desse íon e modular mecanismos de proteção celular. Os resultados desse estudo demonstraram que a suplementação com NPZnO durante a MIV apresentou um perfil dose-dependente. A concentração de 1,5 µg/mL promoveu uma maior taxa de maturação nuclear e aumento na produção de blastocistos, sugerindo um ambiente mais favorável ao desenvolvimento oocitário e embrionário. Em contrapartida, a suplementação com 7,5 µg/mL exerceu um efeito deletério, comprometendo a maturação oocitária e resultando na produção de embriões com maior índice apoptótico.

No contexto biológico, o comportamento das nanopartículas é diretamente influenciado por suas características físico-químicas, como tamanho hidrodinâmico e carga superficial, as quais determinam sua interação com biomoléculas, membranas celulares e processos de internalização (Blanco; Shen; Ferrari, 2015). Dessa forma, a primeira etapa do presente estudo teve como objetivo a caracterização físico-química das NPZnO testadas.

A literatura descreve que nanopartículas com tamanhos entre 30 e 50 nm são frequentemente associadas a maior interação com membranas celulares e captação por mecanismos de endocitose, embora essa resposta seja dependente do tipo celular e do meio biológico (Albanese; Tang; Chan, 2012). No presente estudo, as NPZnO apresentaram tamanho hidrodinâmico médio variando entre 42 e 54 nm após a dispersão por ultrassonicação, mantendo-se dentro da faixa considerada adequada para aplicação em sistemas biológicos. A manutenção desse tamanho nanométrico é relevante, uma vez que a redução do tamanho das nanopartículas aumenta significativamente a área de superfície específica, o que pode favorecer reações de oxirredução e dissolução parcial, contribuindo para a liberação de íons Zn^{2+} no meio (Mendes et al., 2025).

Apesar do tamanho médio favorável, as análises de DLS indicaram um índice de polidispersão (PDI) variando de 0,575 a 0,762, o que classifica as suspensões como moderadamente a altamente polidispersas (Danaei et al., 2018). Essa heterogeneidade foi corroborada pelas imagens de MEV, que evidenciaram a coexistência de partículas em escala nanométrica e estruturas cristalinas de dimensões maiores. Embora valores baixos de PDI sejam desejáveis em sistemas clássicos de entrega de fármacos, a polidispersidade observada neste estudo pode ser consistente com um perfil de dissolução diferencial, no qual partículas menores tendem a se dissolver mais rapidamente, enquanto partículas maiores ou aglomerados podem atuar como reservatórios de liberação gradual de Zn^{2+} (Rupasinghe, 2011). Essa hipótese sugere um fornecimento mais contínuo de íons zinco durante a maturação oocitária, reduzindo picos abruptos de liberação e, conseqüentemente, o risco de toxicidade aguda associado à dissolução rápida de nanopartículas muito pequenas (Hu, 2012).

Em relação à estabilidade coloidal, o potencial Zeta de aproximadamente -10 mV, observado em todas as concentrações, indica baixa estabilidade eletrostática, uma vez que valores absolutos inferiores a 30 mV estão associados a maior tendência à aglomeração (Marsalek, 2014). No entanto, em meios biológicos complexos, como o MIV suplementado com soro fetal bovino, a estabilidade das nanopartículas não depende apenas da carga superficial, mas também da interação com as proteínas presentes no meio (Anders et al., 2015). A carga superficial levemente negativa é compatível com a adsorção de proteínas séricas, favorecendo a formação da chamada “corona proteica”. Srivastav et al. (2019) demonstraram que, embora nanopartículas não revestidas (*bare-ZnO*) apresentem alta tendência à agregação e à adsorção de opsoninas, a presença de proteínas do soro, como a albumina, pode revestir a sua superfície, reduzir a aglomeração excessiva e modular tanto a biodisponibilidade como a toxicidade do zinco (Srivastav et al., 2019). Assim, embora o potencial Zeta sugira instabilidade eletrostática, o comportamento observado é condizente com o esperado para nanopartículas expostas a um ambiente biológico rico em proteínas.

Ainda nessa etapa de caracterização, foram conduzidos os ensaios de espectroscopias Raman e Infravermelho com o objetivo de confirmar a identidade química e a integridade estrutural das NPZnO. O espectro Raman apresentou bandas compatíveis com a fase cristalina wurtzita, com picos em 332, 380, 413 e 438 cm^{-1} ,

sendo esse último atribuído ao modo $E_2(\text{high})$, indicativo de elevada qualidade cristalina e simetria da rede hexagonal do ZnO (Jin et al., 2009; Thiruvengadathan et al., 2022). De forma complementar, a espectroscopia na região do infravermelho revelou um pico em 678 cm^{-1} atribuído ao estiramento da ligação Zn–O, característico da rede cristalina do óxido de zinco (Singh; Sharma; Kim, 2020). Os sinais detectados em 2337 cm^{-1} e 2362 cm^{-1} foram associados à absorção de CO_2 atmosférico, fenômeno recorrente em análises realizadas sem controle atmosférico, não indicando contaminação orgânica ou alterações estruturais da amostra (Ahmed et al., 2024). Em conjunto, os resultados das análises espectroscópicas confirmam a identidade química e a integridade estrutural do ZnO presente nas nanopartículas utilizadas nesse estudo.

Uma vez confirmadas a identidade química, a integridade estrutural e o comportamento coloidal das NPZnO, tornou-se possível interpretar de forma mais segura os efeitos biológicos observados durante a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário.

No presente estudo, a concentração de $1,0\text{ }\mu\text{g/mL}$ não demonstrou diferença estatisticamente significativa na taxa de desenvolvimento embrionário em relação ao grupo controle, diferentemente do observado para a concentração de $1,5\text{ }\mu\text{g/mL}$. Essa observação é relevante no contexto da definição da janela terapêutica das NPZnO aplicadas à produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE). Enquanto Abdel-Halim et al. (2018) sugeriram que os efeitos benéficos das NPZnO estariam restritos à faixa de $0,7$ a $1,0\text{ }\mu\text{g/mL}$, com indícios de toxicidade já em $1,5\text{ }\mu\text{g/mL}$, Quintão et al. (2024) não observaram diferenças significativas nas taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário entre os grupos controle, NPZnO $1,0\text{ }\mu\text{g/mL}$ e NPZnO $1,5\text{ }\mu\text{g/mL}$ em embriões bovinos produzidos *in vitro*. As divergências observadas entre os resultados da literatura referentes aos efeitos das NPZnO nas taxas de desenvolvimento embrionário podem estar relacionadas às variações na composição do meio de maturação *in vitro*, que influenciam as características físico-químicas das nanopartículas como tamanho, carga superficial e formação da corona proteica. Dessa forma, os efeitos biológicos das NPZnO não dependem exclusivamente da sua concentração, mas também, de características físico-químicas próprias de cada lote de nanopartículas (o que varia segundo o processo de síntese) e de sua interação com o meio de cultivo (Abdel-Halim; Moselhy; Helmy, 2018; Anders et al., 2015; Quintão et al., 2024; Srivastav et al., 2019).

O fato de a concentração de 1,5 µg/mL não ter reduzido os níveis de EROs em oócitos, ao mesmo tempo que esteve associada ao aumento da lipoperoxidação nos blastocistos, sugere que o efeito benéfico observado pode não estar associado a um mecanismo antioxidante clássico. Esse achado pode ser relacionado a um possível efeito hormético, no qual um estímulo oxidativo leve atua como sinal metabólico, promovendo ativação celular, reorganização metabólica e retomada meiótica mais eficiente. No trabalho de Soto-Heras & Paramio (2020), foi descrito que níveis moderados de EROs são essenciais por atuarem como moléculas sinalizadoras para a regulação da competência oocitária e ativação de vias de desenvolvimento. Entretanto, a confirmação desse mecanismo necessita da avaliação direta de marcadores específicos de resposta redox e sinalização antioxidante.

A dissolução parcial das NPZnO e a consequente liberação de Zn²⁺ têm sido apontadas como componentes relevantes das respostas biológicas associadas a essas nanopartículas. O zinco é um cofator essencial para diversas enzimas, fatores de transcrição e proteínas envolvidas na progressão meiótica, estabilidade do fuso e competência citoplasmática. Assim, é plausível que pequenas quantidades de Zn²⁺ liberadas em concentrações mais baixas de NPZnO contribuam para a modulação de vias regulatórias de maturação oocitária, sem necessariamente impactar diretamente uma resposta antioxidante robusta (Sehsah et al., 2019). Em contraste, concentrações mais elevadas (7,5 µg/mL) provavelmente levam ao desequilíbrio iônico e metabólico, explicando os efeitos tóxicos observados no desenvolvimento embrionário.

A análise da maturação nuclear demonstrou que a suplementação com 1,5 µg/mL de NPZnO promoveu um aumento significativo na proporção de oócitos que atingiram a metáfase II, enquanto a concentração de 7,5 µg/mL resultou em uma queda acentuada nesse parâmetro. Segundo Kim et al. (2011), uma concentração ideal de zinco durante a maturação oocitária é essencial para a formação e estabilidade do fuso meiótico e para a pausa em metáfase II. Nesse contexto, a liberação de íons Zn²⁺ pelas NPZnO na concentração de 1,5 µg/mL pode ter aumentado a biodisponibilidade de zinco intracelular para proteínas reguladoras do ciclo, como a Emi2 (Early Mitotic Inhibitor 2), que é dependente de zinco para inibição do complexo promotor da anáfase (APC/C), prevenindo a progressão prematura da meiose e falhas na extrusão do corpúsculo polar (Bernhardt et al., 2011; Kim et al., 2011). Assim, os resultados sugerem que a concentração de 1,5 µg/mL forneceu um aporte adequado de zinco para sustentar a organização do fuso e a progressão

meiótica. Por outro lado, a redução na taxa de maturação nuclear em 7,5 µg/mL pode indicar um efeito citotóxico, culminando em bloqueio do ciclo celular induzido e prejuízo da competência oocitária.

Outro ponto relevante é a possível ação indireta das NPZnO mediada pelas células do cúmulus e pela formação da corona proteica ao redor das nanopartículas no meio de maturação. A adsorção de proteínas séricas à superfície das nanopartículas pode atenuar sua citotoxicidade direta e modular sua internalização (Srivastav et al., 2019). No contexto do complexo *cumulus*-oócito (CCO), Abdel-Halim et al. (2018) observaram que a exposição à NPZnO em concentrações de 0,7 – 1,0 µg/mL esteve associada à baixos níveis de fragmentação de DNA e ao aumento do conteúdo intracelular de glutathiona nas células do cúmulus. Esses achados sugerem que as nanopartículas podem não necessitar ser internalizadas diretamente pelo oócito para exercer efeitos biológicos relevantes. Dessa forma, as NPZnO podem atuar sobre as células do cúmulus, modulando a comunicação parácrina, o metabolismo energético e o microambiente redox que sustenta a maturação oocitária, contribuindo indiretamente para a melhoria da competência do oócito (Abdel-Halim; Moselhy; Helmy, 2018).

Os resultados obtidos com a concentração de 7,5 µg/mL evidenciaram os efeitos citotóxicos. Houve uma redução significativa na taxa de maturação oocitária e queda na produção de blastocistos, associada ao aumento dos níveis de EROs e do índice apoptótico. Esses efeitos ocorreram concomitantemente ao aumento do sinal da sonda Mitotracker Red, cuja captação é dependente do potencial de membrana mitocondrial. O aumento da atividade mitocondrial associado a altos níveis de EROs e apoptose não deve ser interpretado como melhora funcional. Pelo contrário, esse achado é compatível com um estado de hiperpolarização mitocondrial ou com alterações patológicas do potencial de membrana, observadas sob condições de estresse celular severo.

Estudos de toxicidade envolvendo NPZnO, como os de Cho et al. (2011) e Camaioni et al (2021), demonstram que as nanopartículas podem ser internalizadas por endocitose e acumuladas nos lisossomos, onde o ambiente ácido favorece sua rápida dissolução e a liberação de grandes quantidades de íons Zn²⁺ (Camaioni et al., 2021; Cho et al., 2011). O excesso de zinco livre pode inibir enzimas chave da glicólise e do ciclo de Krebs (Floriańczyk; Trojanowski, 2009; Xia et al., 2008) além de desencadear disfunção mitocondrial, incluindo alterações de permeabilidade da

membrana interna, como a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial. Esses eventos estão associados à perda de potencial de membrana, aumento na produção de EROs e à liberação de fatores pró-apoptóticos, como o citocromo C (Vandebriel; De Jong, 2012; Wang et al., 2024). Os dados obtidos pelo ensaio de TUNEL corroboram a ativação da via de morte celular programada. Assim, a concentração de 7,5 µg/mL provavelmente excedeu a capacidade de tamponamento celular mediada por metalotioneínas, convertendo o zinco de um elemento sinalizador essencial em um agente citotóxico.

Em conjunto, os resultados demonstram que os efeitos das NPZnO durante a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário são dependentes tanto das suas características físico-químicas quanto da concentração empregada. As nanopartículas apresentaram tamanho hidrodinâmico compatível com aplicações biológicas, elevada polidispersidade e carga superficial levemente negativa, características que, em meio de maturação suplementado com proteínas, favorecem a formação de corona proteica, a liberação gradual de Zn^{2+} e a interação com o microambiente celular. Nesse contexto, foi identificada uma janela terapêutica funcional, na qual a concentração de 1,5 µg/mL promoveu maior competência oocitária e melhor desempenho embrionário, sem supressão dos níveis de EROs ou da oxidação lipídica, sustentando a hipótese de um mecanismo hormético mediado por estímulo redox moderado. Em contraste, a concentração de 7,5 µg/mL excedeu o limiar adaptativo, resultando em desregulação redox, disfunção mitocondrial, redução da maturação nuclear, queda na produção de blastocistos e aumento do índice apoptótico, caracterizando efeito citotóxico associado ao excesso de Zn^{2+} biodisponível. Assim, os dados indicam que a ação das NPZnO na PIVE bovina não é linear, nem exclusivamente antioxidante, mas resulta de uma interação complexa entre propriedades nanométricas, biodisponibilidade iônica e capacidade adaptativa do sistema biológico.

Embora a ausência de análises ultraestruturais limite a confirmação direta dos mecanismos de internalização, os resultados sugerem que os efeitos benéficos observados em 1,5 µg/mL decorrem da combinação entre sinalização por Zn^{2+} , modulação metabólica hormética e interação com o complexo cúmulus-oócito, apontando a necessidade de estudos futuros que integrem abordagens estruturais, moleculares e funcionais para elucidação dos mecanismos celulares envolvidos.

8 CONCLUSÃO

Conclui-se que a suplementação com NPZnO durante a MIV de oócitos bovinos exerce um efeito dependente da concentração, compatível com um comportamento hormético no sistema de PIVE. A concentração de 1,5 µg/mL mostrou-se citocompatível e biologicamente favorável, promovendo maior taxa de maturação nuclear e aumento da produção de blastocistos, sem induzir desregulação redox ou prejuízos à viabilidade embrionária. Em contraste, a exposição à concentração de 7,5 µg/mL ultrapassou o limiar adaptativo do sistema, resultando em desregulação redox, comprometimento da progressão meiótica, disfunção mitocondrial e aumento da apoptose embrionária. Esses achados indicam que a incorporação de nanomateriais em protocolos reprodutivos deve ser baseada em janelas terapêuticas bem definidas, uma vez que o controle preciso da concentração é determinante para a maximização dos ganhos reprodutivos e da eficiência da PIVE.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HALIM, BakarR; MOSELHY, WalaaA; HELMY, NermeenAtef. 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, 2018.

ABEYDEERA, L. R. In vitro production of embryos in swine. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 257–273, jan. 2002.

ABU EL-NAGA, Eman M. *et al.* Cleavage and in vitro cultivation rates monitoring in culture media supplemented with energy sources, non-essential amino acids, and antioxidants in the buffalo embryos. **BMC Veterinary Research**, v. 20, n. 1, p. 521, 18 nov. 2024.

ADONA, Paulo Roberto *et al.* Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Animal Reproduction Science**, v. 108, n. 1–2, p. 49–65, out. 2008.

AHMED, Waseem *et al.* A Rapid and Simplified Approach to Correct Atmospheric Absorptions in Infrared Spectra. **Analytical Chemistry**, v. 96, n. 45, p. 18052–18060, 12 nov. 2024.

AKIL, Syahrir *et al.* EFFECTS OF ZINC SUPPLEMENTATION ON REPRODUCTIVE PERFORMANCE IN CATTLE: A REVIEW. **Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBI)**, v. 12, n. 1, p. 163–170, 10 jun. 2025.

ALBANESE, Alexandre; TANG, Peter S.; CHAN, Warren C. W. The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 14, n. 1, p. 1–16, 15 ago. 2012.

ANCHORDOQUY, JM *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, 16 out. 2014.

ANDERS, Catherine B. *et al.* Serum Proteins Enhance Dispersion Stability and Influence the Cytotoxicity and Dosimetry of ZnO Nanoparticles in Suspension and Adherent Cancer Cell Models. **Nanoscale Research Letters**, v. 10, n. 1, p. 448, 17 dez. 2015.

ASSAF, Sabrina Silveira. **Produção in vitro de embriões bovinos cultivados em duas atmosferas gasosas utilizando diferentes sistemas de tamponamento**. Botucatu: UNESP, ago. 2007.

BÁEZ, Francisco *et al.* Low oxygen tension during in vitro embryo production improves the yield, quality, and cryotolerance of bovine blastocysts. **Animal Science Journal**, v. 95, n. 1, 28 jan. 2024.

BARHOUM, Ahmed *et al.* Review on Natural, Incidental, Bioinspired, and Engineered Nanomaterials: History, Definitions, Classifications, Synthesis, Properties, Market, Toxicities, Risks, and Regulations. **Nanomaterials**, v. 12, n. 2, p. 177, 6 jan. 2022.

BARKHORDARI, Abolfazl *et al.* Effect of zinc oxide nanoparticles on viability of human spermatozoa. **Iranian journal of reproductive medicine**, v. 11, n. 9, p. 767–71, set. 2013.

BATISTELA, Márcio *et al.* PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES E NOVAS ESTRATÉGIAS NA PRODUÇÃO DE OÓCITOS EM BOVINOS. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 20, n. 46, 30 dez. 2023.

BERNHARDT, Miranda L. *et al.* Zinc Requirement During Meiosis I–Meiosis II Transition in Mouse Oocytes Is Independent of the MOS-MAPK Pathway¹. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 3, p. 526–536, 1 mar. 2011.

BILODEAU-GOESEELS, S. Bovine Oocyte Meiotic Inhibition Before *In Vitro* Maturation and Its Value to *In Vitro* Embryo Production: Does it Improve Developmental Competence? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 4, p. 687–693, 12 ago. 2012.

BLANCO, Elvin; SHEN, Haifa; FERRARI, Mauro. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 941–951, 1 set. 2015.

BOLLWEIN, Heinrich; BITTNER, Lilli. Impacts of oxidative stress on bovine sperm function and subsequent in vitro embryo development. **Animal Reproduction**, v. 15, n. Suppl. 1, p. 703–710, 2018.

CAI, Zhaolong *et al.* Zinc and animal health: an in-depth exploration of its role in physiological functions and regulatory molecular mechanisms. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 169, 9 dez. 2025.

CAMAIONI, Antonella *et al.* Silica encapsulation of ZnO nanoparticles reduces their toxicity for cumulus cell-oocyte-complex expansion. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 18, n. 1, p. 33, 3 dez. 2021.

CAÑÓN-BELTRÁN, Karina *et al.* Nobiletin enhances the development and quality of bovine embryos in vitro during two key periods of embryonic genome activation. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 11796, 3 jun. 2021.

CETICA, P. D. *et al.* Antioxidant Enzyme Activity and Oxidative Stress in Bovine Oocyte In Vitro Maturation. **IUBMB Life**, v. 51, n. 1, p. 57–64, 3 jan. 2001.

CHEN, Bonan *et al.* Cellular zinc metabolism and zinc signaling: from biological functions to diseases and therapeutic targets. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, p. 6, 3 jan. 2024.

CHO, Wan-Seob *et al.* Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn²⁺ dissolution inside lysosomes. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 8, n. 1, p. 27, 6 dez. 2011.

CONTI, Marco *et al.* Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, n. 1–2, p. 153–159, fev. 2002.

CORRÊA, Geórgia Assis *et al.* Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 2–4, p. 132–142, mar. 2008.

CROCOMO, Letícia Ferrari *et al.* PRODUÇÃO DE EMBRIÕES IN VITRO: ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 4, p. 470–479, 5 abr. 2023.

DANAEI, M. *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 18 maio 2018.

DAS, Joydeep *et al.* Potential toxicity of engineered nanoparticles in mammalian germ cells and developing embryos: treatment strategies and anticipated applications of nanoparticles in gene delivery. **Human Reproduction Update**, v. 22, n. 5, p. 588–619, set. 2016.

DE CAMARGO, Janine *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, jun. 2022.

DE MUNCK, N. *et al.* Influence of ultra-low oxygen (2%) tension on in-vitro human embryo development. **Human Reproduction**, v. 34, n. 2, p. 228–234, 1 fev. 2019.

DI MEO, Sergio *et al.* Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. 1, 12 jan. 2016.

DIVVELA, Satya Srirama Karthik *et al.* Navigating redox imbalance: the role of oxidative stress in embryonic development and long-term health outcomes. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 13, 26 mar. 2025.

EIXENBERGER, Josh E. *et al.* Rapid Dissolution of ZnO Nanoparticles Induced by Biological Buffers Significantly Impacts Cytotoxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 30, n. 8, p. 1641–1651, 21 ago. 2017.

FENG, Xiaoyi *et al.* Heat-Stress Impacts on Developing Bovine Oocytes: Unraveling Epigenetic Changes, Oxidative Stress, and Developmental Resilience. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 9, p. 4808, 28 abr. 2024.

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

FERREIRA, Elisa Melo *et al.* Maturação citoplasmática de oócitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 3, p. 172–181, set. 2008.

FEUGANG, Jean-Magloire *et al.* Impact of pro-oxidant agents on the morula-blastocyst transition in bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, n. 3, p. 339–346, jul. 2005.

FLORIAŃCZYK, Bolesław; TROJANOWSKI, Tomasz. Inhibition of respiratory processes by overabundance of zinc in neuronal cells. **Folia neuropathologica**, v. 47, n. 3, p. 234–9, 2009.

GAETKE, L. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. **Toxicology**, v. 189, n. 1–2, p. 147–163, 15 jul. 2003.

GALLEGO, F. *et al.* Bovine in vitro Embryo Production: State of the Art. **ESPOCH Congresses: The Ecuadorian Journal of S.T.E.A.M.**, v. 2, n. 1, p. 172–185, 14 jun. 2022.

GIMENO, Isabel *et al.* The Metabolic Signature of In Vitro Produced Bovine Embryos Helps Predict Pregnancy and Birth after Embryo Transfer. **Metabolites**, v. 11, n. 8, p. 484, 27 jul. 2021.

GUEMRA, S. *et al.* Maturação in vitro de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1616–1624, dez. 2013.

GUERIN, P. 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, 1 mar. 2001.

GULTEKIN, M. *et al.* The effects of zinc oxide nanoparticles on the oxidative stress, caspase-3, cytokine and immunity in rats. **Veterinární medicína**, v. 70, n. 10, p. 379–392, 31 out. 2025.

HA, Khoi-Nguyen *et al.* Increased Glutathione Synthesis through an ARE-Nrf2–Dependent Pathway by Zinc in the RPE: Implication for Protection against Oxidative Stress. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 6, p. 2709, 1 jun. 2006.

H Aidari, Abdul Jamil; RAHMANI, Abdul Halim. Zinc Oxide Nanoparticles: A Comprehensive Review on Synthesis and Properties. **International Journal of Current Science Research and Review**, v. 08, n. 07, 22 jul. 2025.

HALLBERG, Ida; LASKOWSKI, Denise; SJUNNESSON, Ylva C. B. In vitro maturation of bovine and porcine oocytes as a versatile model for toxicity and metabolism studies. **Biology of Reproduction**, 24 jun. 2025.

HALLIWELL, Barry; WHITEMAN, Matthew. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231–255, 29 maio 2004.

HANSEL, W. The potential for improving the growth and development of cultured farm animal oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 79, n. 3–4, p. 191–201, dez. 2003.

HANSEN, Peter J. The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle—why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it? **Journal of Animal Science**, v. 98, n. 11, 1 nov. 2020.

HAROON, Naila; STINE, Keith J. Electrochemical Detection of Hormones Using Nanostructured Electrodes. **Coatings**, v. 13, n. 12, p. 2040, 4 dez. 2023.

HASHEM, Nesrein M. *et al.* Use of GnRH-Encapsulated Chitosan Nanoparticles as an Alternative to eCG for Induction of Estrus and Ovulation during Non-Breeding Season in Sheep. **Biology**, v. 12, n. 3, p. 351, 22 fev. 2023.

HEGDE, Vinayakprasanna N. Biomedical Applications of ZnO Nanoparticles: A Paradigm Shift in Healthcare. **Letters in Applied NanoBioScience**, v. 13, n. 3, p. 132, 30 set. 2024.

HEIDARI, Jalil *et al.* Effect of Nano Zinc Oxide on Post-Thaw Variables and Oxidative Status of Moghani Ram Semen. *In*: 2018. Disponível em: <<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:92987025>>

HOMMA, Kengo *et al.* SOD1 as a Molecular Switch for Initiating the Homeostatic ER Stress Response under Zinc Deficiency. **Molecular Cell**, v. 52, n. 1, p. 75–86, out. 2013.

HU, C. W. Aggregation and Dissolution of ZnO Nanoparticles in Solutions. **Asian Journal of Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 3045–3048, 10 fev. 2012.

JIN, Yunxia *et al.* XPS and Raman scattering studies of room temperature ferromagnetic ZnO:Cu. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 42, n. 21, p. 215007, 7 nov. 2009.

KAGEYAMA, Atsuko *et al.* **The oocyte zinc transporter Slc39a10/Zip10 is a regulator of zinc sparks during fertilization in mice.** , 19 nov. 2025.

KAMENI, Serge Leugoué; DLAMINI, Notsile Hleliwe; FEUGANG, Jean Magloire. Exploring the full potential of sperm function with nanotechnology tools. **Animal Reproduction**, v. 21, n. 3, 2024.

KANDIL, Omaima *et al.* Effect of melatonin, zinc sulfate, nano-melatonin, and nano-zinc oxide on mitochondria function and developmental competence of buffalo oocytes. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, n. 0, p. 1, 2025.

KEANE, Jessica A.; EALY, Alan D. An Overview of Reactive Oxygen Species Damage Occurring during In Vitro Bovine Oocyte and Embryo Development and the Efficacy of

Antioxidant Use to Limit These Adverse Effects. **Animals**, v. 14, n. 2, p. 330, 21 jan. 2024.

KHALIL, Wael A. *et al.* Impact of selenium nano-particles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 126, p. 121–127, mar. 2019.

KHALIL, Wael A. *et al.* Effect of zinc chloride and sodium selenite supplementation on *in vitro* maturation, oxidative biomarkers, and gene expression in buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. **Zygote**, v. 29, n. 5, p. 393–400, 26 out. 2021.

KHUSHNOOD, Muhammad. Nanomaterials: Surface Area to Volume Ratio. **J Mater Sci Nanomater**, v. 8, p. 159, 2024.

KIM, Alison M. *et al.* Zinc Sparks Are Triggered by Fertilization and Facilitate Cell Cycle Resumption in Mammalian Eggs. **ACS Chemical Biology**, v. 6, n. 7, p. 716–723, 15 jul. 2011.

KITAGAWA, Yuichiro *et al.* Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1186–1197, out. 2004.

KRISHER, Rebecca L.; HERRICK, Jason R. Bovine embryo production *in vitro*: evolution of culture media and commercial perspectives. **Animal Reproduction**, v. 21, n. 3, 2024.

LAVANYA, Maharajan *et al.* Fabrication and characterization of progesterone loaded pullulan nanofibers for controlled release. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 91, p. 105193, jan. 2024.

LEITE, Roberta Ferreira *et al.* Oxidative Stress Alters the Profile of Transcription Factors Related to Early Development on *In Vitro* Produced Embryos. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, n. 1, 25 jan. 2017.

LIANG, Tingting *et al.* Zinc treatment prevents type 1 diabetes-induced hepatic oxidative damage, endoplasmic reticulum stress, and cell death, and even prevents possible steatohepatitis in the OVE26 mouse model: Important role of metallothionein. **Toxicology Letters**, v. 233, n. 2, p. 114–124, mar. 2015.

LIMA, Émerson Silva; ABDALLA, Dulcinéia Saes Parra. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293–303, 2001.

LODDE, Valentina *et al.* Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: Interplay with gap junction functionality and developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 6, p. 740–749, 30 jun. 2007.

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

LUBERDA, Zofia. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive biology**, v. 5, n. 1, p. 5–17, mar. 2005.

MANIKKARAJA, Chidhambaram *et al.* A novel method to detect bovine sex pheromones using l-tyrosine-capped silver nanoparticles: Special reference to nanosensor based estrus detection. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 203, p. 111747, jan. 2020.

MARREIRO, Dilina *et al.* Zinc and Oxidative Stress: Current Mechanisms. **Antioxidants**, v. 6, n. 2, p. 24, 29 mar. 2017.

MARSALEK, Roman. Particle Size and Zeta Potential of ZnO. **APCBEE Procedia**, v. 9, p. 13–17, 2014.

MELLO, Raquel Rodrigues Costa *et al.* Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 2, p. 58–64, jun. 2016.

MENDES, Ana Rita *et al.* Functional Properties and Safety Considerations of Zinc Oxide Nanoparticles Under Varying Conditions. **Nanomaterials**, v. 15, n. 12, p. 892, 10 jun. 2025.

MESALAM, Ahmed Atef *et al.* Induction of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction by Juglone Affects the Development of Bovine Oocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 168, 26 dez. 2020.

MIGLIO, Luisa *et al.* Zinc oxide-curcumin nanoparticles supplementation during oocyte maturation improves bovine *in vitro* embryo production. **Zygote**, v. 33, n. 4, p. 210–215, 11 ago. 2025.

MINGOTI, Gisele Zoccal. **Maturação oocitária associada à esteroidogênese. Papel do soro sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteróides.** Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 14 abr. 2000.

MOHAMMAD, Faruq *et al.* Influence of Surface Coating towards the Controlled Toxicity of ZnO Nanoparticles In Vitro. **Coatings**, v. 13, n. 1, p. 172, 12 jan. 2023.

MOHD YUSOF, Hidayat *et al.* Optimization of biosynthesis zinc oxide nanoparticles: Desirability-function based response surface methodology, physicochemical characteristics, and its antioxidant properties. **OpenNano**, v. 8, p. 100106, 1 nov. 2022.

NEL, Andre *et al.* Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622–627, 3 fev. 2006.

NUTTINCK, Fabienne *et al.* PTGS2-Related PGE2 Affects Oocyte MAPK Phosphorylation and Meiosis Progression in Cattle: Late Effects on Early Embryonic Development. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 6, p. 1248–1257, 1 jun. 2011.

ODHIAMBO, John F. *et al.* Increased Conception Rates in Beef Cattle Inseminated with Nanopurified Bull Semen¹. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 4, 1 out. 2014.

OLIVEIRA, Clara Slade *et al.* Embryo biopsies for genomic selection in tropical dairy cattle. **Animal Reproduction**, v. 20, n. 2, 2023.

OTEIZA, Patricia I. Zinc and the modulation of redox homeostasis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 9, p. 1748–1759, nov. 2012.

PARRISH, John J. Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 67–73, jan. 2014.

PATRÓN-ROMERO, Leslie *et al.* Mitochondrial Dysfunction Induced by Zinc Oxide Nanoparticles. **Crystals**, v. 12, n. 8, p. 1089, 4 ago. 2022.

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, out. 2010.

PINHEIRO, Antônia Kaylyanne *et al.* Parâmetros genéticos da produção in vitro de embriões das raças Nelore e Senepol. **Ciência Animal Brasileira**, v. 25, 2024.

PIOLTINE, Elisa Mariano *et al.* Treatment of in vitro-Matured Bovine Oocytes With Tauroursodeoxycholic Acid Modulates the Oxidative Stress Signaling Pathway. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 19 fev. 2021.

PONTES, J. H. F. *et al.* Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v. 74, n. 8, p. 1349–1355, nov. 2010.

POWELL, Saul R. The Antioxidant Properties of Zinc. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1447S-1454S, maio 2000.

QUINTÃO, Carolina C. R. *et al.* Antioxidant effects and compatibility of zinc oxide nanoparticles during in vitro maturation of bovine oocytes and subsequent embryo development. **Theriogenology**, v. 230, p. 1–7, dez. 2024.

RASOOL, Akhter *et al.* Applications of Nanotechnology in Animal Reproduction: An Overview. **The Indian Journal of Animal Reproduction**, v. 46, n. 3, p. 15–23, 26 set. 2025.

RATCHAMAK, Ruthaiporn *et al.* Coenzyme Q10 Supplementation Effects on In Vitro Oocyte Maturation, Lipid Peroxidation, and Embryonic Development in Prepubertal and Aging Thai–Holstein Cows. **Animals**, v. 15, n. 1, p. 18, 25 dez. 2024.

REED, Robert B. *et al.* Solubility of nano-zinc oxide in environmentally and biologically important matrices. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 93–99, 1 jan. 2012.

RICE, James M.; ZWEIFACH, Adam; LYNES, Michael A. Metallothionein regulates intracellular zinc signaling during CD4⁺ T cell activation. **BMC Immunology**, v. 17, n. 1, p. 13, 2 dez. 2016.

RICHANI, Dulama *et al.* Metabolic co-dependence of the oocyte and cumulus cells: essential role in determining oocyte developmental competence. **Human Reproduction Update**, v. 27, n. 1, p. 27–47, 4 jan. 2021.

RIZVI, Syed A. A.; SALEH, Ayman M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. **Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society**, v. 26, n. 1, p. 64–70, jan. 2018.

ROCHA-FRIGONI, Nathália Alves de Souza *et al.* Effects of gaseous atmosphere and antioxidants on the development and cryotolerance of bovine embryos at different periods of *in vitro* culture. **Zygote**, v. 23, n. 2, p. 159–168, 16 abr. 2015.

RUBESSA, Marcello *et al.* Non-invasive analysis of bovine embryo metabolites during *in vitro* embryo culture using nuclear magnetic resonance. **AIMS Bioengineering**, v. 3, n. 4, p. 538–551, 2016.

RUPASINGHE, Thilini. **Dissolution and aggregation of zinc oxide nanoparticles at circumneutral pH; a study of size effects in the presence and absence of citric acid.** [*S.l.: S.n.*].

SALEK, Farzaneh *et al.* Factors Affecting the Success of Ovum Pick-Up, In Vitro Production and Cryopreservation of Embryos in Cattle. **Animals**, v. 15, n. 3, p. 344, 25 jan. 2025.

SEHSAH, Radwa *et al.* Role of Nrf2 in inflammatory response in lung of mice exposed to zinc oxide nanoparticles. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 16, n. 1, p. 47, 16 dez. 2019.

ŞEN, U. Maturation of bovine oocytes under low culture temperature decreased glutathione peroxidase activity of both oocytes and blastocysts. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, p. 93–99, 4 mar. 2021.

SHAH, Manzoor Ahmad; MIR, Shabir Ahmad; BASHIR, Mudasar. Nanoencapsulation of Food Ingredients. *In: [S.l.: S.n.]*. p. 132–152.

SINGH, Satendra Pal; SHARMA, Sanjeev K.; KIM, Deuk Young. Carrier mechanism of ZnO nanoparticles-embedded PMMA nanocomposite organic bistable memory device. **Solid State Sciences**, v. 99, p. 106046, 1 jan. 2020.

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

SOTO-HERAS, Sandra; PARAMIO, Maria-Teresa. Impact of oxidative stress on oocyte competence for *in vitro* embryo production programs. **Research in Veterinary Science**, v. 132, p. 342–350, out. 2020.

SRIVASTAV, Anurag Kumar *et al.* Impact of Surface-Engineered ZnO Nanoparticles on Protein Corona Configuration and Their Interactions With Biological System. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, n. 5, p. 1872–1889, maio 2019.

SUDANO, Mateus J. *et al.* Lipidome signatures in early bovine embryo development. **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p. 472- 484.e1, jul. 2016.

SUGIURA, Koji *et al.* Estrogen Promotes the Development of Mouse Cumulus Cells in Coordination with Oocyte-Derived GDF9 and BMP15. **Molecular Endocrinology**, v. 24, n. 12, p. 2303–2314, dez. 2010.

SUNUWAR, Sajuna; HEO, Yun Seok. Reactive Oxygen Species in Embryo Development: Sources, Impacts, and Implications for In Vitro Culture Systems. **Life**, v. 16, n. 1, p. 136, 15 jan. 2026.

THIRUVENGADATHAN, Rajagopalan *et al.* Template-free chemical deposition of highly crystalline ZnO nanorod thin films. **Materials Advances**, v. 3, n. 13, p. 5383–5392, 2022.

TORRES-OSORIO, Viviana *et al.* Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en la producción in vitro de embriones mamíferos. Revisión. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, v. 10, n. 2, p. 433–459, 17 jun. 2019.

UEDA, Shugo *et al.* Redox Control of Cell Death. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 4, n. 3, p. 405–414, jun. 2002.

VAN DEN HURK, Robert; ZHAO, Jia. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717–1751, abr. 2005.

VANDEBRIEL, Rob; DE JONG, Wim. A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. **Nanotechnology, Science and Applications**, p. 61, ago. 2012.

VARAGO, Fabiana Cristina; MENDONÇA, Luiza Fernandes; LAGARES, Monique de Albuquerque. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 100–109, jun. 2008.

VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 476–481, 2017.

VIANA, João Henrique Moreira *et al.* Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 1–2, p. 1–12, ago. 2004.

WANG, Yifan *et al.* ZnO NPs Impair the Viability and Function of Porcine Granulosa Cells Through Autophagy Regulated by ROS Production. **Antioxidants**, v. 13, n. 11, p. 1295, 25 out. 2024.

WU, Fan; HARPER, Bryan J.; HARPER, Stacey L. Comparative dissolution, uptake, and toxicity of zinc oxide particles in individual aquatic species and mixed populations. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 591–602, 7 jan. 2019.

WU, Guoyao *et al.* Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 3, p. 489–492, mar. 2004.

XIA, Tian *et al.* Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. **ACS Nano**, v. 2, n. 10, p. 2121–2134, 28 out. 2008.

YUAN, Y. Q. *et al.* Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. **Theriogenology**, v. 59, n. 7, p. 1585–1596, abr. 2003.

ZHANG, Peipei *et al.* Combination of CNP, MT and FLI during IVM Significantly Improved the Quality and Development Abilities of Bovine Oocytes and IVF-Derived Embryos. **Antioxidants**, v. 12, n. 4, p. 897, 7 abr. 2023.

ZHAO, Xue-Ming *et al.* Melatonin improves the fertilization capacity and developmental ability of bovine oocytes by regulating cytoplasmic maturation events. **Journal of Pineal Research**, v. 64, n. 1, 11 jan. 2018.

ZHOU, Xian-Qing *et al.* Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Modification, and Applications in Food and Agriculture. **Processes**, v. 11, n. 4, p. 1193, 13 abr. 2023.

ZHOU, Xinli *et al.* Hydroxyapatite nanoparticles improved survival rate of vitrified porcine oocytes and its mechanism. **Cryo letters**, v. 36, n. 1, p. 45–50, 2015.