

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Pedro Henrique Silva Ribeiro

**EFEITOS DOS ÁCIDOS OLEICO E ESTEÁRICO NA MATURAÇÃO *IN*
VITRO DE OÓCITOS BOVINOS**

Belo Horizonte
2025

Pedro Henrique Silva Ribeiro

EFEITOS DOS ÁCIDOS OLEICO E ESTEÁRICO NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

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

Área de concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Álan Maia Borges

Coorientadora: Dra. Clara Slade Oliveira

Belo Horizonte
2025

Ribeiro, Pedro Henrique Silva, 1998 -
R484e Efeitos dos ácidos oleico e esteárico na maturação in vitro de oócitos
bovinos/ Pedro Henrique Silva Ribeiro.- 2025.
48f: il.

Orientador: Alan Maia Borges
Coorientadora: Clara Slade Oliveira
Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola de Medicina Veterinária da
UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal.
Área de Concentração: Reprodução Animal.
Bibliografias: f. 46 – 48.

1. Bovino - Teses - 2. Reprodução Animal - Teses – 3. Fertilização in
vitro – Teses. 4. Embriões – Teses - I. Borges, Alan Maia - II. Oliveira, Clara
Slade – III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária -
IV. Título.

CDD – 636.089 26

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

PEDRO HENRIQUE SILVA RIBEIRO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós Graduação em **CIÊNCIA ANIMAL**, como requisito para obtenção do grau de **MESTRE** em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração **Reprodução Animal**. Defesa da dissertação intitulada: "**Efeitos dos ácidos esteárico e oleico na maturação in vitro de oócitos bovinos.**"

Aprovado(a) em 06 de fevereiro de 2025, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Alan Maia Borges - Orientador(a)
Dr.(a). Gabriel Augusto Monteiro
Dr.(a). Ana Carolina Leite Albeny
Dr.(a). Telma da Mata Martins



Documento assinado eletronicamente por **Alan Maia Borges, Professor(a)**, em 06/02/2025, às 15:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Telma da Mata Martins, Usuário Externo**, em 07/02/2025, às 13:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina Leite Albeny, Professora do Magistério Superior**, em 10/02/2025, às 19:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Augusto Monteiro, Usuário Externo**, em 20/02/2025, às 07:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3937301** e o código CRC **787EF2F1**.

DEDICATÓRIA

À minha família, pelo amor, paciência e incentivo nos momentos mais desafiadores. Sem vocês, este sonho não seria possível.

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta dissertação representa a realização de um sonho e, como toda grande conquista, não teria sido possível sem o apoio de muitas pessoas.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela força, resiliência e oportunidades ao longo desta jornada.

À minha família, especialmente aos meus pais Arlete e Antônio e irmãs Maira, Natália e Anna Beatriz, pelo amor incondicional, paciência e incentivo em todos os momentos. Vocês foram minha base e minha maior motivação para seguir em frente.

Ao meu orientador, Álvaro Maia Borges, por toda a dedicação, ensinamentos e pela orientação paciente e inspiradora durante este percurso. Seu conhecimento e apoio foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À EMBRAPA Gado de Leite na pessoa da minha Coorientadora Clara Slade Oliveira, por ter me recebido de braços abertos, me ensinado e orientado durante todo esse processo, bem como à Dra. Naiara Zoccal Saraiva, idealizadora do projeto de pesquisa, e a toda equipe do laboratório, pelo acolhimento e amizade.

Aos amigos, Laura, Lucas, Rafaelle, Lays, André, Mayra e Márcia que estiveram presentes nos momentos de tensão e incerteza, oferecendo palavras de incentivo, apoio emocional e, claro, algumas boas risadas que aliviaram a pressão.

À UFMG e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, pelo suporte acadêmico e pelas oportunidades de crescimento profissional e intelectual.

Aos Professores Sandra Gesteira, Letícia Zoccolaro e Ana Carolina Leite por todos ensinamentos, e à Eliane Beatriz por toda ajuda e amizade no Laboratório. E a todos os alunos que pude auxiliar e transmitir o conhecimento.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta dissertação se tornasse realidade, meu sincero muito obrigado!

A veterinária me escolheu ainda no ventre de minha mãe, este momento é muito mais que o fechamento de um ciclo, é a concretização, de uma missão divina!

"Eu sou porque nós somos."
(Conceito de Ubuntu)

RESUMO

A maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos é influenciada pela composição lipídica do meio de cultivo, fator que pode afetar a competência oocitária e o desenvolvimento embrionário. O ácido oleico, um ácido graxo monoinsaturado, está associado à melhoria da fluidez de membranas, à modulação da atividade mitocondrial e à proteção contra o estresse oxidativo. Este estudo avaliou o efeito da suplementação com ácido oleico (25 μ M) durante a MIV, em comparação ao ácido esteárico (25 μ M) e a um grupo controle. A atividade mitocondrial não diferiu entre os oócitos ($P = 0,300$), porém foi maior nas células do cumulus do grupo ácido oleico (mediana = 34.331) em relação ao controle (24.987) e ao ácido esteárico (22.676; $P < 0,001$). O estresse oxidativo nos oócitos foi inferior no grupo ácido oleico (10.732) em relação ao controle (12.575), embora sem significância estatística ($P = 0,056$). A peroxidação lipídica foi menor no grupo ácido oleico tanto nos oócitos (0,386) quanto nas células do cumulus (0,656) quando comparado ao controle (0,658 e 0,946, respectivamente), com diferenças significativas para as células do cumulus ($P < 0,001$). A expressão da enzima esteroil-CoA dessaturase 1 (SCD1) foi mais elevada no grupo ácido esteárico em relação ao controle e ao grupo ácido oleico ($P < 0,001$). Conclui-se que o ácido oleico é um suplemento promissor para a MIV, favorecendo parâmetros associados à qualidade oocitária e podendo contribuir para maior eficiência em protocolos de produção *in vitro* de embriões bovinos.

Palavras-chave: ácido oleico; produção *in vitro* de embriões; estresse oxidativo; maturação *in vitro* de oócitos; metabolismo lipídico; bovinos.

ABSTRACT

In vitro maturation (IVM) of bovine oocytes is influenced by the lipid composition of the culture medium, which can affect oocyte competence and embryonic development. Oleic acid, a monounsaturated fatty acid, is associated with improved membrane fluidity, modulation of mitochondrial activity, and protection against oxidative stress. This study evaluated the effect of oleic acid supplementation (25 μ M) during IVM, compared to stearic acid (25 μ M) and a control group. Mitochondrial activity did not differ among oocytes ($P = 0.300$) but was higher in cumulus cells from the oleic acid group (median = 34,331) compared to the control (24,987) and stearic acid (22,676; $P < 0.001$). Oxidative stress in oocytes was lower in the oleic acid group (10,732) compared to the control (12,575), although not statistically significant ($P = 0.056$). Lipid peroxidation was reduced in the oleic acid group for both oocytes (0.386) and cumulus cells (0.656) compared to the control (0.658 and 0.946, respectively), with significant differences for cumulus cells ($P < 0.001$). Stearic acid led to higher expression of the stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) enzyme compared to the control and oleic acid groups ($P < 0.001$). It is concluded that oleic acid is a promising supplement for IVM, improving parameters associated with oocyte quality and potentially increasing the efficiency of *in vitro* embryo production protocols in cattle.

Keywords: oleic acid; *in vitro* embryo production; oxidative stress; *in vitro* oocyte maturation; lipid metabolism; cattle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 molécula de ácido oleico	16
Figura 2 - Atividade mitocondrial (MitoTracker).....	30
Figura 3 - Atividade mitocondrial e estresse oxidativo em oócitos bovinos.....	30
Figura 4 - Atividade mitocondrial e estresse oxidativo em células do cúmulus bovino	31
Figura 5 – Estresse oxidativo (CellROX).....	32
Figura 6 – Peroxidação lipídica (BODIPY C11).....	33
Figura 7 – Peroxidação lipídica em oócitos bovinos.....	34
Figura 8 – Peroxidação lipídica em células do cúmulus bovino	35
Figura 9 – Expressão da enzima SCD1 (A555).....	36
Figura 10 - Expressão da enzima SCD1 em complexos cúmulus-oócito bovinos.....	37
Figura 11 – Canais de fluorescência de MitoTracker® e CellROX® em oócitos bovinos.....	39
Figura 12 – Imagem de fluorescência de BODIPY™ 581/591 C11 em células do cúmulus.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE – Ácido Esteárico
AO – Ácido Oleico
ATP – Adenosina Trifosfato
BSA – Albumina Sérica Bovina
C – Controle
CACO2 – Câncer Coli
CAT – Catalase
CLA – Ácido Linoleico Conjugado
CO₂ – Dióxido de Carbono
COCs – Complexos Cumulus-Oócitos
DMSO – Dimetilsulfóxido
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
FIV – Fertilização *in vitro*
GPX – Glutathione Peroxidase
HDL – High Density Lipoprotein - Lipoproteína de Alta Densidade
HNE – Hidroxinonenal
LDL – Low Density Lipoprotein - Lipoproteína de Baixa Densidade
MDA – Malondialdeído
MIV – Maturação *in vitro*
NAC – N-acetilcisteína
NMN – Nicotinamida Mononucleotídeo
PBS – Solução Tampão Fosfato-Salina
PIVE – Produção *in vitro* de embriões
REDOX – Reações De Oxidação-Redução
ROI – Região de Interesse (Region of Interest)
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio (Reactive Oxygen Species)
SCD1 – Esteroil-CoA Dessaturase 1
SFB – Soro Fetal Bovino
SOD – Superóxido Dismutase
TALP – Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate - Tyrode, Albumina Lactato Piruvato
TCM-199 – Meio de Cultura Tissular 19

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	12
2.0	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	Composição dos meios de maturação	13
2.2	Incorporação de lipídeos pelo oócito	14
2.3	Utilização de ácido oleico na nutrição, em meios de cultura e na medicina	16
2.4	Utilização de ácido esteárico na medicina humana e veterinária	17
2.5	Estresse oxidativo na produção <i>in vitro</i> de embriões	18
2.6	Atividade Mitocondrial em Oócitos Bovinos	19
2.7	Peroxidação lipídica na produção <i>in vitro</i> de embriões	20
2.8	Enzima SCD1 na maturação <i>in vitro</i> de oócitos	22
3.0	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Meios de cultura e montagem das placas de cultivo	24
3.2	Avaliação da atividade mitocondrial	25
3.3	Avaliação do estresse oxidativo	25
3.4	Avaliação da peroxidação lipídica	26
3.5	Atividade da enzima SCD1	27
3.6	Processamento de Imagens	28
3.7	Análises estatísticas	28
4.0	RESULTADOS	29
4.1	Atividade mitocondrial	29
4.2	Estresse oxidativo	31
4.3	Peroxidação Lipídica	32
4.4	Atividade da enzima SCD1	35
5.0	DISCUSÃO	37
5.1	Atividade Mitocondrial	37
5.2	Estresse oxidativo	39

5.3	Peroxidação Lipídica	40
5.4	Atividade da enzima SCD1	42
6.0	CONCLUSÃO	44
7.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1.0 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões é uma biotecnologia de grande importância no mercado mundial da bovinocultura, apesar de pouco difundida pelo país, tem ganhado espaço como alternativa para produção de cruzamentos, ou ainda para obter o máximo de potencial genético na prole.

Apesar de ser uma técnica bem fundamentada e estruturada, ainda possui pontos a serem aprimorados, como as taxas de sobrevivência, maturação, apoptose que contribuem diretamente para a eficiência da técnica em gerar um embrião viável para a transferência. Um dos pontos críticos desse processo é a composição lipídica dos oócitos e embriões, questionamentos sobre a quantidade de lipídeos intracelulares e o perfil desses lipídeos são estudados cada dia mais, já que estes são de extrema importância para o desenvolvimento embrionário e impactam diretamente nos resultados da criopreservação.

Assim sendo, alternativas como adição de ácidos graxos aos meios de cultivo celular vêm sendo estudadas buscando detectar um ponto que possa otimizar os resultados sem comprometer a viabilidade embrionária.

Uma das alternativas de lipídeo é o ácido oleico, um ácido graxo monoinsaturado, que possui propriedades benéficas demonstradas em diversas outras áreas da medicina. Bezerra et al., 2020 constataram que o ácido oleico pode atenuar a resposta inflamatória em células. Esse ácido desempenha importante papel na melhoria da fluidez da membrana celular, que é um fator essencial para a funcionalidade e integridade celular (Vireque et al., 2017). Além disso, Cheng et al., 2014, afirmam que o ácido oleico protege contra o estresse oxidativo, uma condição que pode comprometer a qualidade e o potencial de desenvolvimento dos oócitos, durante a maturação *in vitro*.

Outro lipídeo de interesse seria o ácido Esteárico, um ácido graxo saturado e bastante abundante no fluido folicular. Devido a sua saturação ele pode ser mais susceptível à peroxidação lipídica, mas uma característica o torna mais interessante para este trabalho, o fato deste ser um precursor para o ácido oleico.

A enzima esteroil-CoA dessaturase 1 (SCD1) é um componente fundamental para a maturação de oócitos, devido seu papel no metabolismo lipídico. A SCD1 catalisa a conversão de ácidos graxos saturados em insaturados, como por exemplo do ácido esteárico para o ácido oleico, que é essencial para a manutenção da fluidez e funcionalidade das membranas celulares (Launay, 2023). Além disso, a atividade da SCD1 está intimamente ligada à regulação do metabolismo energético e à resposta ao estresse oxidativo, fatores críticos para a qualidade e competência de desenvolvimento dos oócitos (Launay, 2023). Alterações na atividade da SCD1 podem resultar em perfis lipídicos desbalanceados, prejudicando a maturação e a viabilidade dos oócitos (Vireque et al., 2017).

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da suplementação com ácidos graxos no meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos, analisando seu impacto sobre a qualidade oocitária, utilizando como parâmetro os indicadores de estresse oxidativo, atividade mitocondrial, peroxidação lipídica, e atividade e expressão da enzima SCD1, que se correlaciona com o metabolismo lipídico nos oócitos.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Composição dos meios de maturação

Os meios de MIV geralmente contêm uma combinação de aminoácidos, vitaminas, hormônios e fatores de crescimento, que são essenciais para o desenvolvimento adequado dos oócitos. Tendo como base o TCM199 (*Tissue Culture Medium 199*) compondo cerca de 90 a 95% do meio MIV (Tabela 1). Além disso, hormônios que mimetizam o ambiente folicular como estrógeno, LH e FSH são adicionados para que ocorra a maturação citoplasmática e nuclear do oócito.

Estudos sobre a suplementação com antioxidantes, como a quercetina, pode reduzir o estresse oxidativo, um fator prejudicial à qualidade dos oócitos e embriões (Guemra et al., 2013).

Componente	Concentração
TCM-199	90–95%
FSH	0,5–10 µg/mL
LH	1–10 µg/mL
Estradiol-17β	1 µg/mL
Soro fetal bovino (SFB) ou BSA	10%
Cisteamina	100 µM
Antibióticos (penicilina/estreptomicina)	50–100 IU/mL
Piruvato	0,2 mM
Lactato	2–5 mM
Glicose	5,5 mM

Tabela 1 Composição básica de meio de maturação in vitro

Outro aspecto importante na composição dos meios de MIV é a presença de soro fetal bovino (SFB). Embora o SFB seja frequentemente utilizado, pesquisas indicam que a redução ou substituição deste componente por outros compostos pode melhorar a eficiência da maturação e a qualidade dos embriões (Collado et al., 2014; Amaral et al., 2022). A utilização de alternativas ao SFB, como o BSA, mio-inositol, também tem mostrado resultados promissores, contribuindo para a melhora no desenvolvimento dos blastômeros (Aureliano et al., 2023).

2.2 Incorporação de lipídeos pelo oócito

A incorporação de lipídios pelos oócitos é um processo essencial para a maturação e o desenvolvimento embrionário inicial, sendo regulado por diversos mecanismos que envolvem transporte, armazenamento e metabolismo energético. Os ácidos graxos presentes no fluido folicular são transportados para os oócitos por meio de proteínas transportadoras de ácidos graxos e difusão passiva, além da interação com lipoproteínas de alta densidade (HDL), as quais são absorvidas pelos oócitos através de receptores específicos (Dunning et al., 2014). A lipoproteína lipase e outras lipases extracelulares também desempenham um papel fundamental na mobilização

de lipídios das lipoproteínas para as células da granulosa e, conseqüentemente, para os oócitos (Prates et al., 2014).

O armazenamento lipídico ocorre em gotículas no citoplasma do oócito, sendo estas reguladas por proteínas da família Perilipina, que modulam a acessibilidade aos lipídios estocados (Kim et al., 2001). Os principais lipídios armazenados incluem triacilgliceróis (TAG) e fosfolipídios, como fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, sendo a composição lipídica influenciada pelo meio de *cultivo in vitro*, particularmente pela presença de soro fetal bovino (SFB) (Carro et al., 2013).

Durante a maturação do complexo *cumulus oophorus* (COC), os lipídios são utilizados como fonte de energia por meio da β -oxidação mitocondrial, processo essencial para a manutenção da viabilidade e competência oocitária (Dunning et al., 2014). A ativação da β -oxidação no oócito aumenta significativamente ao longo da maturação, sendo fundamental para o desenvolvimento embrionário precoce (Prates et al., 2014). Evidências demonstram que o bloqueio farmacológico dessa via metabólica compromete a maturação nuclear e citoplasmática, reduzindo a competência do oócito para o desenvolvimento subsequente (Dunning et al., 2014). Além disso, a presença das células do cumulus influenciam diretamente o metabolismo lipídico do oócito, uma vez que a remoção dessas células resulta em menores níveis de lipídios intracelulares, sugerindo que elas fornecem substratos energéticos cruciais para a maturação oocitária (Carro et al., 2013).

A composição lipídica do oócito pode ser modulada por fatores ambientais e nutricionais, incluindo a suplementação com ácidos graxos essenciais, como o ácido linoleico (LA), que pode ser incorporado às membranas celulares na forma de fosfolipídios e triglicerídeos, aumentando a disponibilidade de lipídios para β -oxidação e influenciando positivamente a competência oocitária (Carro et al., 2013). Estudos indicam que a adição de ácido linoleico conjugado (CLA) pode alterar a composição lipídica das membranas celulares dos oócitos, melhorando suas características funcionais e aumentando a taxa de desenvolvimento embrionário após a fecundação (Leite et al., 2017).

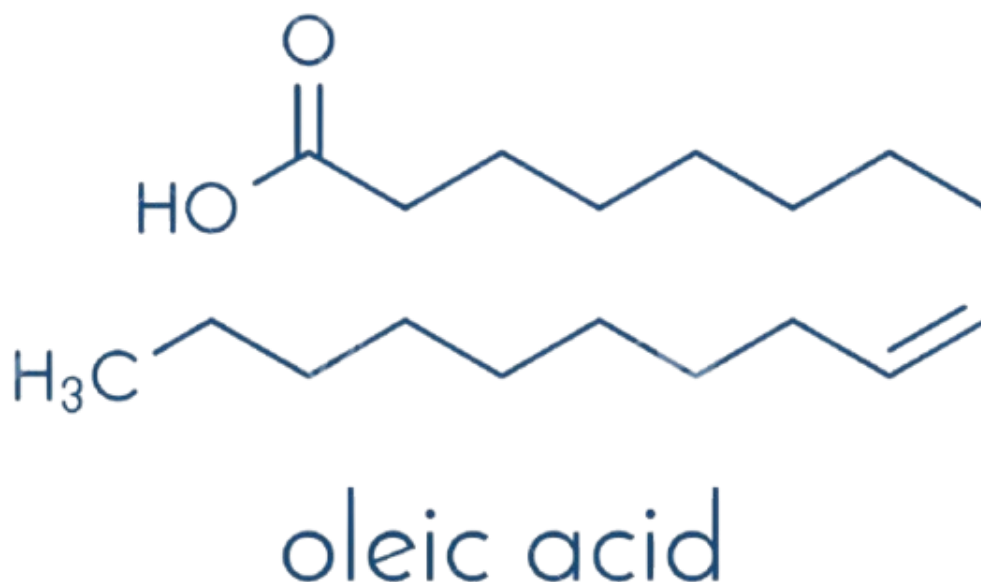
Entretanto, um acúmulo excessivo de lipídios, especialmente ácidos graxos saturados, pode comprometer a qualidade do oócito e o desenvolvimento embrionário

subsequente, evidenciando a importância do equilíbrio na regulação lipídica para a otimização da biotecnologia reprodutiva (Dunning et al., 2014).

2.3 Utilização de ácido oleico na nutrição, em meios de cultura e na medicina

O ácido oleico (C18:1, ω -9) é um ácido graxo monoinsaturado amplamente encontrado em óleos vegetais, tais como azeite de oliva e óleo de abacate, e é reconhecido por suas propriedades benéficas à saúde. A estrutura química do ácido oleico é caracterizada por uma cadeia longa de átomos de carbono contendo uma única dupla ligação, que confere a ele características de estabilidade e resistência à oxidação lipídica. Além disso, o ácido oleico não reduz as concentrações de HDL (High Density Lipoprotein - Lipoproteína de Alta Densidade) no sangue, conforme indicado em estudos que analisam a composição lipídica de diferentes óleos (Nozaki et al., 2012; Silva et al., 2012).

Figura 1 molécula de ácido oleico



A presença de ácido oleico em dietas está associada à redução do risco de doenças cardiovasculares, devido sua capacidade de diminuir as concentrações de

LDL (Low Density Lipoprotein - Lipoproteína de Baixa Densidade) e triglicerídeos (Gewehr et al., 2012).

A beta-oxidação do ácido oleico ocorre principalmente nas mitocôndrias, onde é degradado em subunidades de dois átomos de carbono, formando acetil-CoA, que pode ser utilizado no ciclo de Krebs para a produção de energia. Este processo é crucial para a geração de ATP em células que utilizam ácidos graxos como fonte de energia (Ferreira et al., 2012). A beta-oxidação também é um mecanismo importante na regulação do metabolismo lipídico, influenciando a homeostase energética e a composição lipídica das membranas celulares (Canuto & Buzato, 2015).

Na medicina humana e veterinária, o ácido oleico tem sido estudado por suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Estudos indicam que ele pode ter papel na cicatrização de feridas, embora a evidência clínica ainda seja limitada e mais pesquisas sejam necessárias para estabelecer diretrizes claras para sua aplicação prática (Ferreira et al., 2012). Além disso, a suplementação de dietas com ácido oleico em ruminantes tem mostrado melhorar a qualidade do leite, influenciando positivamente o perfil de ácidos graxos do leite produzido (Ribeiro et al., 2014).

No contexto do cultivo celular e produção de embriões, o ácido oleico tem demonstrado efeitos benéficos. A adição de ácidos graxos em meios de cultura tem sido associada ao aumento da viabilidade e resistência dos embriões ao congelamento, o que é crucial para a preservação de linhagens celulares e a produção de embriões, em técnicas de reprodução assistida (Leite et al., 2017). A utilização de ácidos graxos, como o ácido oleico, em meios de cultura pode melhorar a qualidade dos embriões, promovendo ambiente mais favorável ao desenvolvimento celular (Domingues et al., 2014).

2.4 Utilização de ácido esteárico na medicina humana e veterinária

O ácido esteárico (C18:0), é um ácido graxo saturado de cadeia longa, é um componente relevante na nutrição animal por estar presente em alimentos de consumo frequente como grãos, além de ser produzido no rúmen por biohidrogenação de ácidos graxos insaturados especialmente em vacas leiteiras. Sua presença no fluido folicular é abundante e seu impacto na produção in vitro de embriões (PIV) têm sido áreas de crescente interesse na pesquisa científica.

O fluido folicular de vacas contém uma diversidade de lipídios, incluindo ácidos graxos como o ácido esteárico que desempenham funções fundamentais na maturação oocitária e no desenvolvimento embrionário. Estudos sugerem que a composição lipídica do FF pode influenciar a habilidade dos oócitos em se desenvolver no ambiente *in vitro*. O ácido esteárico, por ser um precursor de lipídios de membrana e de energia, é considerado crucial para o desenvolvimento adequado dos embriões (Ribeiro et al., 2014).

2.5 Estresse oxidativo na produção *in vitro* de embriões

O estresse oxidativo é um dos principais desafios para a produção *in vitro* de embriões bovinos, afetando diretamente a qualidade e a viabilidade dos oócitos. Esse fenômeno ocorre quando há desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante celular, resultando em danos estruturais e funcionais, como peroxidação lipídica, fragmentação do DNA e disfunção mitocondrial (Lin & Wang, 2020).

O metabolismo mitocondrial é uma das principais fontes de EROs nos oócitos, e a exposição prolongada a essas moléculas pode comprometer a competência oocitária, reduzindo a taxa de fecundação, e impactando negativamente o desenvolvimento embrionário inicial (Silva & Silva, 2023). A produção excessiva de EROs também pode desregular a homeostase do cálcio e induzir apoptose celular, contribuindo para a menor taxa de formação de blastocistos (Pioltine et al., 2021).

Para minimizar esses efeitos, os oócitos possuem mecanismos de defesa antioxidante, tais como as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutationala peroxidase (GPX) e catalase (CAT), que atuam na neutralização das EROs e na manutenção da estabilidade celular (Barrozo et al., 2021). No entanto, durante a maturação *in vitro*, a ausência do ambiente fisiológico ovariano pode reduzir a eficiência desses sistemas, tornando necessária a suplementação com antioxidantes exógenos.

Os estudos de Silva & Silva, 2023 indicam que a adição de compostos como melatonina, N-acetilcisteína (NAC) e resveratrol ao meio de cultivo pode melhorar a

qualidade oocitária, reduzindo o estresse oxidativo, e aumentando as taxas de desenvolvimento embrionário. A melatonina, por exemplo, regula a expressão de genes antioxidantes e protege contra danos mitocondriais, enquanto a NAC atua como precursora da glutatona, fortalecendo a defesa celular contra os radicais livres (Lin & Wang, 2020).

Além da influência direta no metabolismo do oócito, o estresse oxidativo também afeta as células do cumulus, que desempenham papel fundamental na nutrição e comunicação celular durante a maturação oocitária (Keane & Ealy, 2024). A peroxidação lipídica e o acúmulo de EROs nessas células podem comprometer a expansão das células do cumulus, reduzindo o fornecimento de substratos energéticos essenciais para o desenvolvimento do oócito (Wang et al., 2023). Dessa forma, o controle do estresse oxidativo no ambiente de cultivo é essencial para garantir a maturação oocitária eficiente, otimizando a competência embrionária. Estratégias como o ajuste da concentração de oxigênio na estufa incubadora e a modulação do perfil lipídico do meio de cultivo têm sido exploradas para mitigar os efeitos do estresse oxidativo (Silva & Silva, 2023).

A manutenção do equilíbrio redox é essencial para a preservação da qualidade oocitária, sendo que alterações nesse sistema podem comprometer a viabilidade dos embriões produzidos *in vitro*. A exposição prolongada dos embriões a elevadas concentrações de EROs pode desregular vias metabólicas críticas, levando à desorganização do citoesqueleto, reduzindo a compactação celular e aumentando a taxa de apoptose (Martin et al., 2022). Estudos sugerem que a otimização do meio de cultivo com antioxidantes pode melhorar significativamente a qualidade dos embriões, aumentando o número total de células e reduzindo a incidência de apoptose, contribuindo para taxas mais elevadas de desenvolvimento embrionário (Wang et al., 2023).

2.6 Atividade Mitocondrial em Oócitos Bovinos

A atividade mitocondrial desempenha papel essencial no desenvolvimento e na competência dos oócitos, sendo responsável pela geração de ATP, manutenção do potencial de membrana mitocondrial, e regulação das concentrações de espécies

reativas de oxigênio (ROS) (Kirillova et al., 2021). Oócitos bovinos, devido à sua alta demanda energética, dependem fortemente da função mitocondrial para processos como maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário precoce (Dadarwal et al., 2024). No entanto, diversos fatores, incluindo o envelhecimento, o estresse oxidativo e técnicas de manipulação *in vitro*, podem comprometer essa função e reduzir a competência do oócito.

A criopreservação dos oócitos por vitrificação, por exemplo, tem sido amplamente estudada devido ao seu impacto na atividade mitocondrial. A exposição a crioprotetores e o rápido resfriamento podem induzir alterações morfológicas e moleculares, como o inchaço mitocondrial e a redução do potencial de membrana mitocondrial, resultando em menores taxas de fecundação e desenvolvimento embrionário (Gutierrez-Castillo et al., 2023). Além disso, a vitrificação pode reduzir as concentrações de ATP e aumentar a produção de ROS, comprometendo a homeostase celular e a viabilidade do oócito (Rodríguez-Nuevo et al., 2022).

Para mitigar esses efeitos, diversas abordagens têm sido exploradas, incluindo o uso de antioxidantes e a suplementação mitocondrial. Compostos como o leonurine e o ácido ferúlico demonstraram potencial na redução do estresse oxidativo e na melhoria da função mitocondrial, aumentando as concentrações de ATP e reduzindo danos oxidativos ao DNA mitocondrial (Yin et al., 2023; Zheng et al., 2023). Além disso, a suplementação com nicotinamida mononucleotídeo (NMN) foi associada com a melhoria da função mitocondrial e com a redução de anormalidades cromossômicas nos oócitos, favorecendo o desenvolvimento embrionário (Hashimoto et al., 2025).

2.7 Peroxidação lipídica na produção *in vitro* de embriões

A peroxidação lipídica é um processo destrutivo causado pelo acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio (EROs), afetando a viabilidade e o desenvolvimento dos oócitos bovinos. Este processo ocorre devido à oxidação de ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares, resultando na formação de aldeídos tóxicos, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE), que comprometem a integridade estrutural das células reprodutivas (Keane & Ealy, 2024). Estudos demonstram que o estresse oxidativo gerado por EROs pode

comprometer o desenvolvimento embrionário, especialmente em sistemas de produção *in vitro* (PIV), onde a exposição a tensões ambientais exacerbadas contribui para o acúmulo de radicais livres (Cao et al., 2022).

A composição lipídica dos oócitos é um fator crítico para o processo de maturação, bem como para a competência do desenvolvimento embrionário. Os ácidos graxos insaturados, como o ácido oleico e o linoleico, desempenham papel protetor contra a peroxidação lipídica, promovendo maior estabilidade da membrana e aumentando a resistência ao estresse oxidativo, durante a criopreservação e maturação *in vitro* (Melo-Sterza & Poehland, 2021).

O aumento da fluidez da membrana, conferido por esses lipídios, melhora a homeostase celular, reduzindo a suscetibilidade dos oócitos aos danos oxidativos (Wang et al., 2021). Por outro lado, a presença excessiva de ácidos graxos saturados, como o ácido palmítico e o esteárico, tem sido associada à ativação de vias apoptóticas e à redução da taxa de desenvolvimento embrionário, devido ao aumento da produção de EROs (Keane & Ealy, 2024).

A adição de ácidos graxos insaturados ao meio de cultura tem sido associada com a maior taxa de sobrevivência de embriões, mitigando os efeitos deletérios do estresse oxidativo (Gao et al., 2023). Além disso, a presença de antioxidantes endógenos, como glutathione peroxidase (GPX4), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), é essencial para neutralizar os radicais livres gerados no metabolismo mitocondrial (Cao et al., 2022). Estratégias como a adição de antioxidantes exógenos, incluindo melatonina e resveratrol, demonstraram eficiência na redução da peroxidação lipídica e na melhoria das taxas de desenvolvimento embrionário em protocolos de maturação *in vitro* (Wang et al., 2021).

A peroxidação lipídica também está diretamente associada com a disfunção mitocondrial, que pode afetar a produção de ATP e comprometer a competência oocitária (Keane & Ealy, 2024). Durante a maturação oocitária, a atividade mitocondrial é essencial para a geração de energia, e qualquer desequilíbrio na homeostase redox pode levar à fragmentação mitocondrial e à ativação de vias apoptóticas (Zheng et al., 2023). O estresse oxidativo causado pela peroxidação lipídica pode, portanto, reduzir a eficiência dos processos de maturação, fecundação e desenvolvimento inicial do embrião (Cao et al., 2022).

2.8 Enzima SCD1 na maturação *in vitro* de oócitos

A esteroil-CoA dessaturase 1 (SCD1) é uma enzima essencial para a conversão de ácidos graxos saturados em monoinsaturados, desempenhando papel crítico na homeostase lipídica e na regulação da fluidez da membrana celular. Nos oócitos, a SCD1 é fundamental para a manutenção da integridade estrutural e funcional, contribuindo para a maturação e o desenvolvimento inicial do embrião (Niu et al., 2023). A atividade dessa enzima influencia diretamente a organização do citoesqueleto e a formação de gotículas lipídicas, que servem como reservas energéticas fundamentais durante a embriogênese (Kong & Gao, 2024). Além disso, a SCD1 está associada à regulação do metabolismo lipídico nos ovários, e a expressão dessa enzima é modulada por fatores hormonais e ambientais (Niu et al., 2023).

A deficiência de SCD1 impacta negativamente o desenvolvimento embrionário, levando à redução na fluidez da membrana e ao comprometimento da polarização celular, elementos cruciais para a diferenciação do trofotoderma e a formação do blastocisto (Kong & Gao, 2024).

Estudos mostram que a ausência da SCD1 resulta na ativação da via RPs-Mdm2-p53, desencadeando estresse oxidativo e apoptose celular, o que compromete a viabilidade embrionária (Niu et al., 2023). Além disso, a regulação inadequada da biossíntese de ácidos graxos insaturados pode levar a alterações no metabolismo energético e à disfunção mitocondrial, afetando diretamente a capacidade do embrião de se desenvolver até o estágio de blastocisto (Sun et al., 2024).

No contexto da biologia reprodutiva, a SCD1 também se relaciona com a plasticidade da membrana plasmática e a organização do citoesqueleto. A inibição dessa enzima compromete a distribuição de proteínas estruturais, tais como queratina 8 e queratina 18, resultando em falhas na delimitação das células embrionárias e na formação da blastocèle (Niu et al., 2023). Além disso, a presença de fosfolipídios insaturados na membrana celular, regulada pela SCD1, é essencial para a comunicação intercelular e a ativação de vias metabólicas relacionadas ao crescimento embrionário (Xuan et al., 2022). Estudos também sugerem que a

deficiência de SCD1 pode afetar a resposta ao estresse celular e a capacidade de implantação embrionária no endométrio, reduzindo as taxas de implantação e o sucesso gestacional (Niu et al., 2023).

A modulação da SCD1 tem sido investigada como estratégia potencial para melhorar a qualidade dos oócitos, otimizando o desenvolvimento embrionário em técnicas de reprodução assistida. A suplementação de ácido oleico, um dos produtos da SCD1, demonstrou ser capaz de reverter parcialmente os efeitos deletérios da sua inibição, restaurando a fluidez da membrana e melhorando a viabilidade celular (Kong & Gao, 2024). Além disso, a pesquisa realizada por Niu et al., 2023 indica que a regulação dos lipídios, durante a maturação oocitária, pode ter implicações diretas na qualidade dos embriões e na taxa de sucesso da fecundação *in vitro*. Dessa forma, compreender os mecanismos moleculares que envolvem a SCD1 pode contribuir significativamente para o avanço das biotecnologias reprodutivas.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG). Os produtos químicos foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), e os meios de maturação foram adquiridos da empresa Bioklone® Reprodução Animal (Jaboticabal, São Paulo, Brasil).

Os complexos *cumulus*-oócitos (COCs) foram obtidos de ovários provenientes de fêmeas bovinas abatidas de acordo com o Serviço de Inspeção Federal. O transporte dos ovários foi realizado em garrafa térmica com solução fisiológica (NaCl 0,9%) aquecida à 37°C, contendo antibióticos (estreptomicina e penicilina) e aspirados em um intervalo máximo de uma hora após o fim da coleta. Os COCs foram recuperados a partir de folículos medindo 2-8mm por meio de aspiração folicular realizada por punção com seringas estéreis de 10mL e agulhas descartáveis 40x12G.

O fluido folicular recuperado foi mantido em “banho maria” à 37°C por aproximadamente dez minutos, até que houvesse a completa decantação das células em suspensão. Posteriormente, foi realizado descarte do sobrenadante e a análise do *pellet* formado, diluído em TALP lavagem, composto de Tyrode's (solução salina com íons essenciais e bicarbonato para manter o pH), albumina (geralmente BSA, que

protege e estabiliza as células) e os metabólitos lactato e piruvato (fontes de energia para os gametas). O conteúdo foi examinado sob estereomicroscópio no aumento de 2.5, e apenas os COCs classificados como Grau 1 e Grau 2 foram selecionados seguindo a metodologia proposta por Viana et al (2004). Essa classificação refere-se a COCs com mais de duas camadas de células do *cumulus*, citoplasma homogêneo, compactação das células do *cumulus*.

3.1 Meios de cultura e montagem das placas de cultivo

Para a elaboração dos meios de maturação foram desenvolvidas três composições específicas. O primeiro, grupo controle, foi composto do meio de maturação *in vitro* (MIV) comercial sem a adição de soro fetal bovino em sua composição, acrescido de 0,8% de Albumina Sérica Bovina (BSA). O segundo grupo experimental, denominado de AE (ácido esteárico), foi constituído MIV acrescido de 0,99mL de ácido esteárico na concentração de 25 μ M; e o terceiro grupo, denominado como AO (Ácido Oleico), foi composto de MIV acrescido de 0,98mL de ácido oleico na concentração de 25 μ M.

As concentrações e composição utilizadas se espelham no experimento piloto previamente realizado pela equipe de pesquisa da Embrapa.

Na montagem das placas foram utilizadas duas placas *Nunc* de quatro poços. Dois poços foram identificados para cada grupo experimental, e a tampa das placas foi identificada com a data, repetição e experimento.

Os meios de cultura foram mantidos em estufa a 38,5°C, 5% de CO₂ em ar atmosférico e alta umidade e tampados. Cada tubo foi homogeneizado com vórtex por 1 minuto e 30 segundos e, em seguida, 400 μ L de cada meio de cultura foi adicionado aos poços correspondentes a cada grupo experimental. Os tubos foram mantidos com 200 μ L de cada meio, para posterior uso durante a lavagem dos oócitos. Foram adicionados 2mL de água Milli-Q ao espaço entre os poços das placas *Nunc*, armazenadas em estufa com as mesmas condições supracitadas até o momento de seu uso.

Os COCs foram adicionados aos poços e as placas foram incubadas por 24 horas à 38,5°C, 5% de CO₂ em ar atmosférico e alta umidade. Cada experimento contou com três repetições.

Para desnudar os COCs, adicionou-se 100µL de hialuronidase para grupos de 25 COCs e, em seguida, foram submetidos a sucessivas pipetagens até o desnudamento e a separação completa das células do cumulus e os oócitos desnudos. Quando a técnica necessitava de fixação, os oócitos e as células do *cumulus* foram distribuídos em dois microtubos distintos. No primeiro, colocou-se 100µL da solução contendo as células e adicionou-se 100µL de paraformaldeído à 4%. No segundo, os oócitos foram combinados com 100µL de paraformaldeído à 4%. A fixação foi realizada durante 40 minutos. Para o armazenamento e posterior análise, o paraformaldeído foi substituído por Solução Salina Tamponada Fosfatada (PBS) contendo 1% de SFB e mantidas refrigeradas em geladeira à 5°C.

3.2 Avaliação da atividade mitocondrial

A atividade mitocondrial dos oócitos bovinos foi avaliada utilizando a sonda fluorescente MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen, Cat. No. M7512). Inicialmente, a solução estoque de 1mM foi preparada dissolvendo o corante em 94µL de dimetilsulfóxido (DMSO anidro) de alta pureza (99.9%). Para a coloração, 1µL dessa solução estoque foi diluído em 100µL de meio de cultivo TCM-199, resultando em concentração final de 10µM. Os oócitos e as células foram incubados nessa solução a 37°C e 5% de CO₂ por 30 minutos, protegidos da luz. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com TALP lavagem para remover o excesso de corante não ligado. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência EVOS M5000 200 X nos comprimentos de onda 579/599 nm, utilizando-se o canal vermelho. Imagens foram capturadas para posterior avaliação da distribuição e intensidade da fluorescência mitocondrial.

3.3 Avaliação do estresse oxidativo

Para a detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em oócitos bovinos, utilizou-se a sonda fluorescente CellROX™ Green Reagent (Invitrogen, Cat. No. C10444). Uma solução estoque de 2,5mM foi preparada dissolvendo-se o corante em dimetilsulfóxido (DMSO) de alta pureza (99.9%).

Para as análises de estresse oxidativo e atividade mitocondrial utilizou-se a seguinte composição: C (Controle; n =77); AE (Ácido Esteárico; n = 73; AO (Ácido Oleico; n = 42. Nas análises das células do *cumulus* foram contadas 210 células por grupo experimental.

Para a coloração, 1µL dessa solução estoque foi diluído em 100µL de meio de cultivo TCM-199, resultando em concentração final de 25µM. Os oócitos foram incubados nessa solução à 37°C e 5% de CO₂ por 30 minutos, protegidos da luz. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com meio TALP lavagem para remover o excesso de corante não ligado. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência EVOS M5000 200X, nos comprimentos de onda 485/520 nm utilizando-se o canal verde. Imagens foram capturadas para posterior avaliação da intensidade de fluorescência, indicando as concentrações de EROs nos oócitos.

3.4 Avaliação da peroxidação lipídica

Para a avaliação da peroxidação lipídica em oócitos bovinos, utilizou-se a sonda fluorescente BODIPY™ 581/591 C11 (Invitrogen, Cat. No. D3861). A solução inicial foi preparada dissolvendo-se 1mg de BODIPY em 400µL de dimetilsulfóxido (DMSO) 99.9%. Posteriormente, a solução estoque foi obtida diluindo-se 50µL dessa solução inicial em 450µL de PBS. Para a coloração, 3µL da solução estoque foram diluídos em 100µL de meio de cultivo TCM-199, resultando em concentração final de 60µM.

Os oócitos foram incubados por 30 minutos a 37°C e 5% de CO₂, protegidos da luz. Após a incubação, as amostras foram lavadas em duas gotas de 100µL de PBS, livres de corantes. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência EVOS M5000 200X, utilizando-se o canal verde para avaliar lipídios oxidados, e o canal vermelho para lipídios não oxidados.

No estado reduzido, a BODIPY™ 581/591 C11 emite fluorescência vermelha e, quando oxidada por radicais lipídicos, há mudança para fluorescência verde. Essa mudança espectral possibilita a detecção da peroxidação lipídica, comparando-se as intensidades de fluorescência nos dois comprimentos de onda. Assim, a razão entre as intensidades de fluorescência verde e vermelha fornece medida quantitativa da peroxidação lipídica, permitindo a comparação entre diferentes grupos experimentais.

Imagens foram capturadas em condições padronizadas de luz e exposição, de modo garantir a comparação entre os grupos experimentais. A composição total dos grupos foram: Controle (n = 69); Ácido Esteárico (n = 138); Ácido Oleico (n = 120). As células do *cumulus* por sua vez se deram da seguinte forma: 223 no grupo Controle, 214 no grupo Ácido Esteárico, e 226 no grupo Ácido Oleico.

3.5 Atividade da enzima SCD1

A análise da atividade da enzima SCD1 foi realizada com diferentes grupos experimentais: grupo de oócitos imaturos, composto por oócitos previamente selecionados e classificados, porém que ainda não foram submetidos à MIV; grupo controle, sem suplementação lipídica; grupo esteárico com suplementação de ácido esteárico; e grupo oleico onde houve a suplementação de ácido oleico.

Nos grupos em que houve a suplementação seguiu-se a metodologia já citada para a confecção dos meios. Todos os oócitos foram fixados seguindo a metodologia proposta neste trabalho e posteriormente submetidos ao processo de coloração para imunofluorescência.

Para a realização da imunofluorescência, as amostras foram inicialmente permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5% por 30 minutos, permitindo o acesso dos anticorpos aos antígenos intracelulares. Em seguida, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS para remover o excesso de detergente. Para bloquear ligações inespecíficas, as amostras foram incubadas em solução de BSA a 5% por um período de 40 a 60 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram incubadas *overnight* (18:00 às 08:00h) com o anticorpo primário para SCD1 diluído na proporção de 1:50, em ambiente refrigerado à 5°C. Após essa etapa, as amostras foram submetidas a três lavagens de 10 a 20 minutos cada, utilizando-se solução de

lavagem contendo Tween 20 a 0,2% e SFB a 2%, para retirar anticorpos não ligados. Em seguida, procedeu-se a incubação com o anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 555 (em canal vermelho), Hoechst 33342 (em canal azul) para contracoloração do núcleo, e BODIPY™ 493/503 (P3922) (em canal verde) para marcação dos lipídeos, por um período de 40 a 60 minutos em temperatura ambiente.

Após essa etapa, as amostras foram novamente lavadas com a solução contendo Tween 20 a 0,2% e SFB a 2%, para remover anticorpos secundários não ligados. Por fim, as amostras foram preparadas para análise por microscopia de fluorescência. Este protocolo baseou-se em metodologias estabelecidas para imunofluorescência, conforme descrito por Thermo Fisher Scientific (2020).

Na interpretação dos dados, considerou-se a expressão da enzima SCD1 e a coloração lipídica com Bodipy 493/503.

3.6 Processamento de Imagens

As imagens foram analisadas no software ImageJ, onde a área total de cada célula foi selecionada utilizando-se a ferramenta "Region of Interest" (ROI). A intensidade média de fluorescência foi medida dentro de cada ROI, permitindo a quantificação da fluorescência em cada pixel dentro da região selecionada, gerando um valor total de intensidade de coloração para cada análise realizada como concentrações de espécies reativas de oxigênio, atividade mitocondrial, peroxidação lipídica e atividade da enzima SCD1 em oócitos e células do *cumulus*. Para garantir a precisão dos resultados, todas as imagens foram processadas sob as mesmas condições de aquisição e análise.

3.7 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software GraphPad InStat 3.1 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Inicialmente, a normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk, e nenhuma das variáveis analisadas apresentou distribuição normal ($P < 0,05$). Diante disso, optou-se pelo uso de testes não paramétricos para comparação entre os grupos experimentais. As

diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner para identificar diferenças específicas entre os grupos. Os resultados foram considerados significativos para $P < 0,05$.

4.0 RESULTADOS

4.1 Atividade mitocondrial

Os valores do Mitotracker dos oócitos não diferiram (Kruskal-Wallis, $P = 0,300$) entre os grupos. As medianas foram de 7.286, 8.944 e 10.734 para os grupos C, AE e AO, respectivamente. O grupo AO apresentou aumento de 47% na mediana, quando comparado com o grupo C, sem significância estatística.

Na análise das células do *cumulus*, para a avaliação de Mitotracker, foram verificadas diferenças (Kruskal-Wallis, $P < 0,001$) entre os grupos. As medianas foram de 22.676, 34.331 e 24.987 para os grupos AE, AO e C, respectivamente. O grupo AO apresentou valores superiores ao grupo C ($W = -9,21$, $P < 0,001$) e ao grupo AE ($W = 9,32$, $P < 0,001$). Não foi verificada diferença significativa entre os grupos AE e C ($W = 2,29$, $P = 0,237$) (Figura 2).

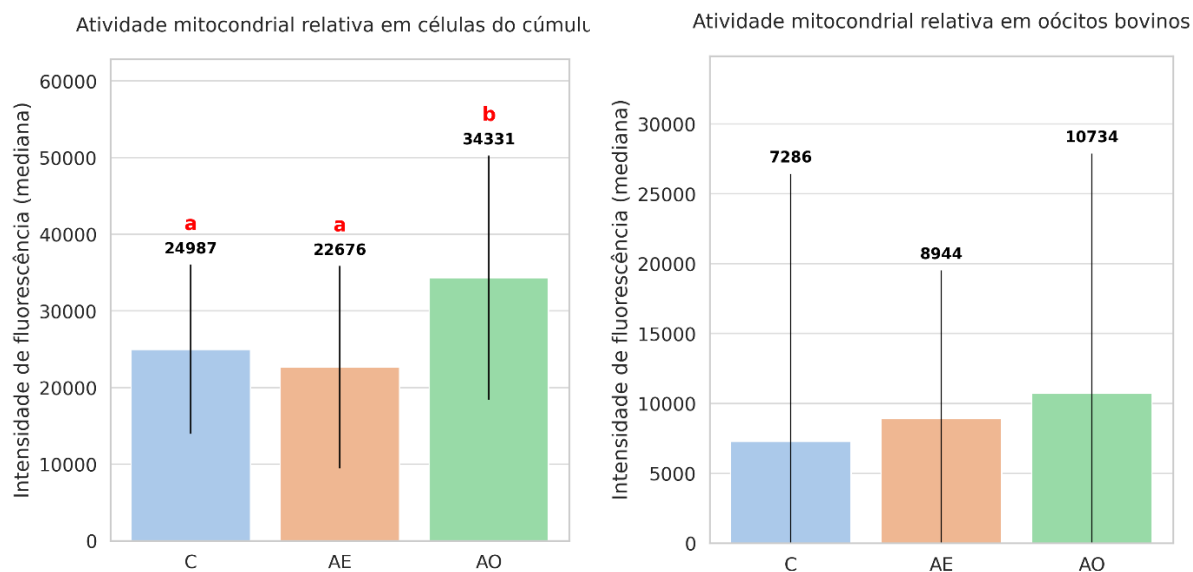


Figura 2 - Atividade mitocondrial (MitoTracker)

Atividade mitocondrial relativa em células do cúmulo e oócitos bovinos maturados in vitro sob diferentes condições de suplementação lipídica, avaliada por fluorescência da sonda MitoTracker®. Valores expressos como mediana e desvio-padrão (Oócitos: C (n=77), AE (n=73), AO (n=42); Cúmulo: C (n=210), AE (n=210), AO (n=210)). Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos pelo teste de Dwass–Steel–Critchlow–Fligner após Kruskal–Wallis ($p < 0,05$).

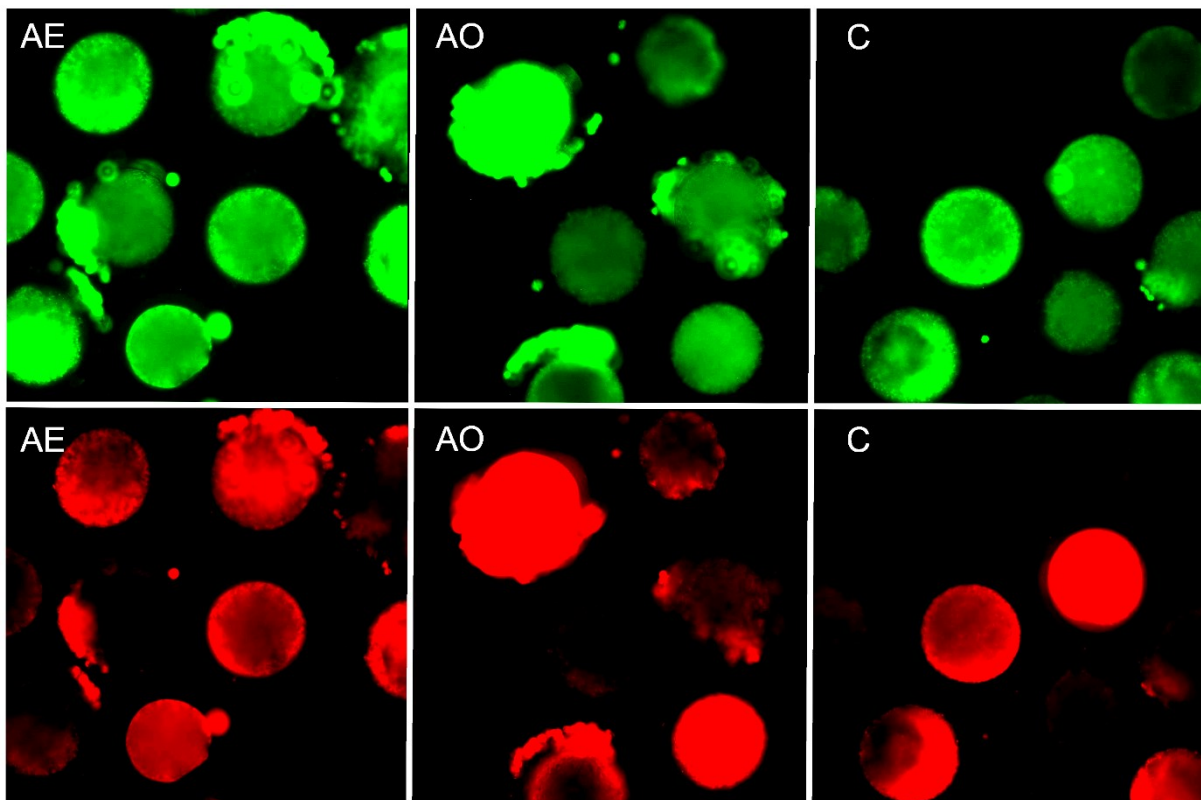


Figura 3 - Atividade mitocondrial e estresse oxidativo em oócitos bovinos

Imagens representativas de oócitos bovinos maturados in vitro, evidenciando atividade mitocondrial (vermelho, sonda MitoTracker®) e estresse oxidativo (verde, sonda CellROX®) nos grupos Controle

(C), Ácido Esteárico (AE) e Ácido Oleico (AO). As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência, com detecção nos canais correspondentes aos comprimentos de onda de emissão das sondas.

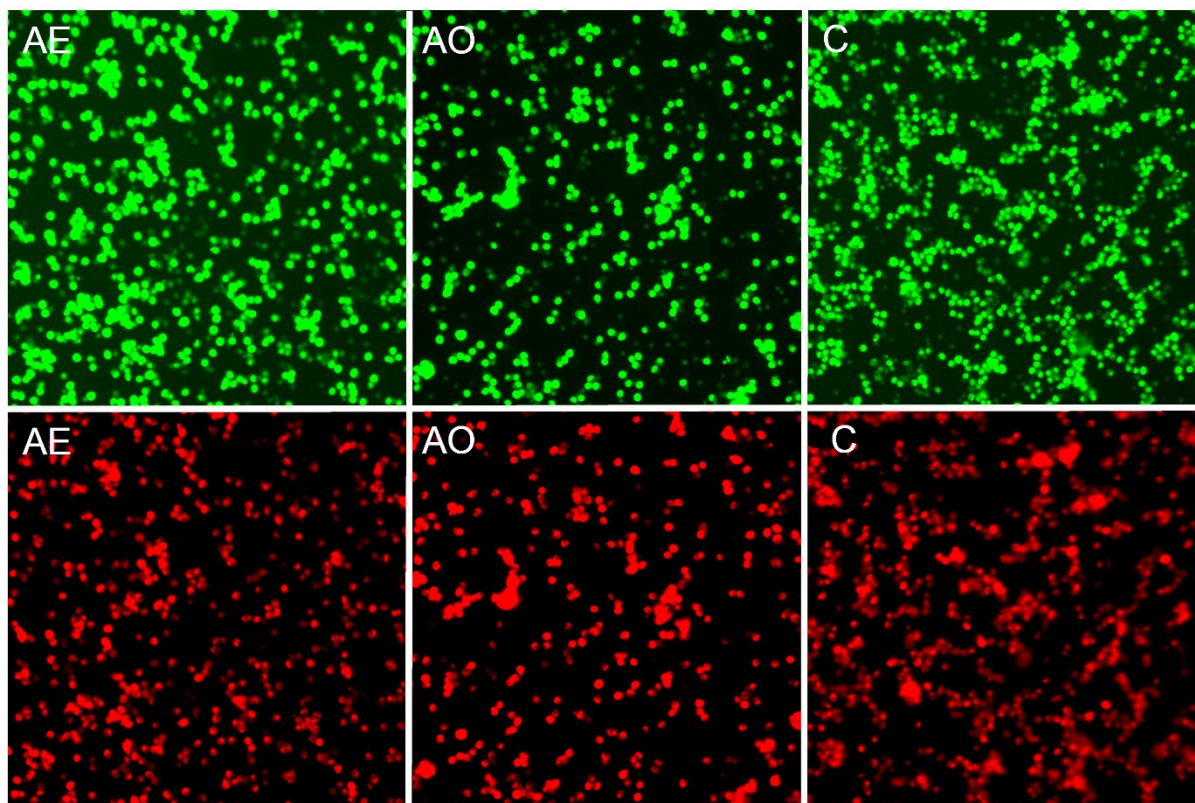


Figura 4 - Atividade mitocondrial e estresse oxidativo em células do cúmulus bovino

Imagens representativas de células do cúmulus bovino maturadas in vitro, evidenciando atividade mitocondrial (vermelho, sonda MitoTracker®) e estresse oxidativo (verde, sonda CellROX®) nos grupos Controle (C), Ácido Esteárico (AE) e Ácido Oleico (AO). As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência, com detecção nos canais correspondentes aos comprimentos de onda de emissão das sondas.

4.2 Estresse oxidativo

A variável CellROX, apesar de apresentar diferença (Kruskal-Wallis, $P = 0,040$) entre os grupos, não diferiu quando realizado o teste de comparações múltiplas. As medianas foram de 12.575, 10.525 e 10.732 para os grupos C, AE e AO, respectivamente. O grupo C apresentou mais estresse oxidativo quando comparado com o grupo AO e grupo AE. Todavia, as comparações múltiplas não foram estatisticamente significativas (C x AO: $W = -3,256$, $P=0,056$; C x AE: $W = -2,840$, $P=0,110$) (Figura 5).

Para as células do *cumulus*, a análise de CellROX não diferiu (Kruskal-Wallis, $P = 0,466$) entre os grupos. As medianas foram de 31.954, 32.986 e 32.068 para os grupos AE,

AO e C, respectivamente, com variações inferiores a 3% entre os grupos experimentais (Figura 5).

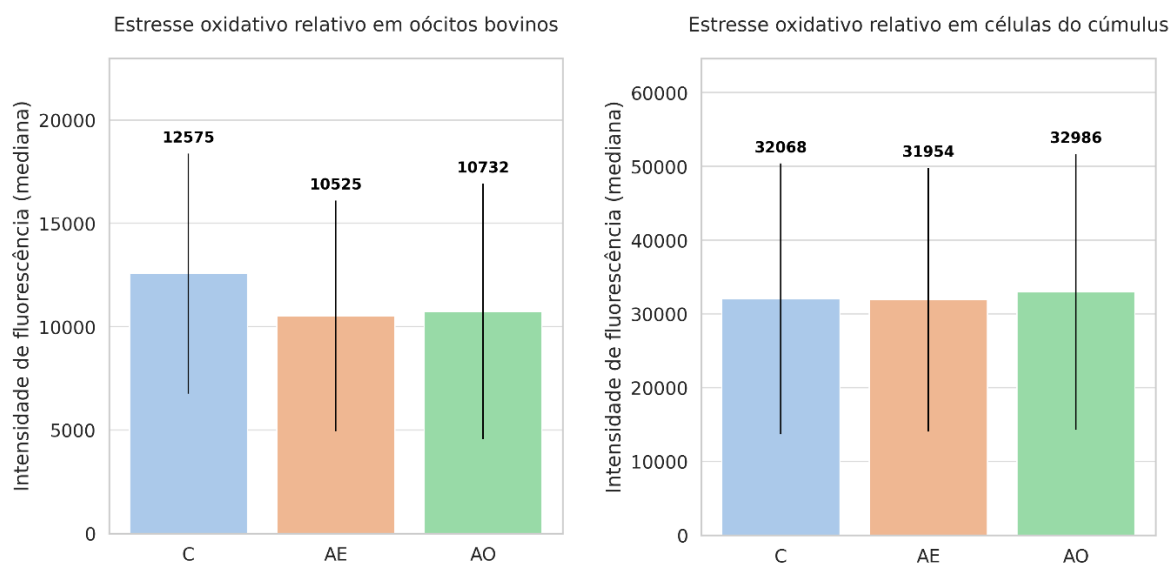


Figura 5 – Estresse oxidativo (CellROX)

Estresse oxidativo relativo em células do cúmulus e oócitos bovinos maturados *in vitro* sob diferentes condições de suplementação lipídica, avaliado por fluorescência da sonda CellROX®. Valores expressos como mediana e desvio-padrão (Oócitos: C (n=77), AE (n=73), AO (n=42); Cúmulus: C (n=210), AE (n=210), AO (n=210)). Não houve diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Dwass–Steel–Critchlow–Fligner após Kruskal–Wallis ($p > 0,05$).

4.3 Peroxidação Lipídica

Nos oócitos, a razão da sonda BODIPY C11 diferiu entre os grupos analisados (Kruskal-Wallis, $P=0,006$). As medianas observadas foram de 0.264, 0.386 e 0.658 para os grupos AE, AO e C, respectivamente. O grupo C apresentou razão maior em relação ao grupo AE ($W=3,52$, $P=0,034$) e maior em comparação ao grupo AO ($W=3,48$, $P=0,037$). Esses resultados sugerem que o grupo AE apresenta os menores níveis de peroxidação lipídica, seguido pelo grupo AO, enquanto o grupo C apresenta as maiores concentrações (Figuras 6 e 7).

Quando analisada nas células do *cumulus*, a razão entre os canais verde e vermelho do BODIPY C11 diferiu entre os grupos AE, AO e C (Kruskal-Wallis, $P < 0,001$). As medianas verificadas foram 0,908, 0,656 e 0,946 para os grupos AE, AO e C, respectivamente. O grupo AO apresentou valores 31% inferiores em relação ao grupo AE ($W= -10,79$, $P < 0,001$) e 31% menores em comparação ao grupo C ($W=$

11,68, $P < 0,001$). Por outro lado, as diferenças entre os grupos AE e C não foram significativas ($W = -1,01$, $P = 0,756$) (Figuras 7 e 8).

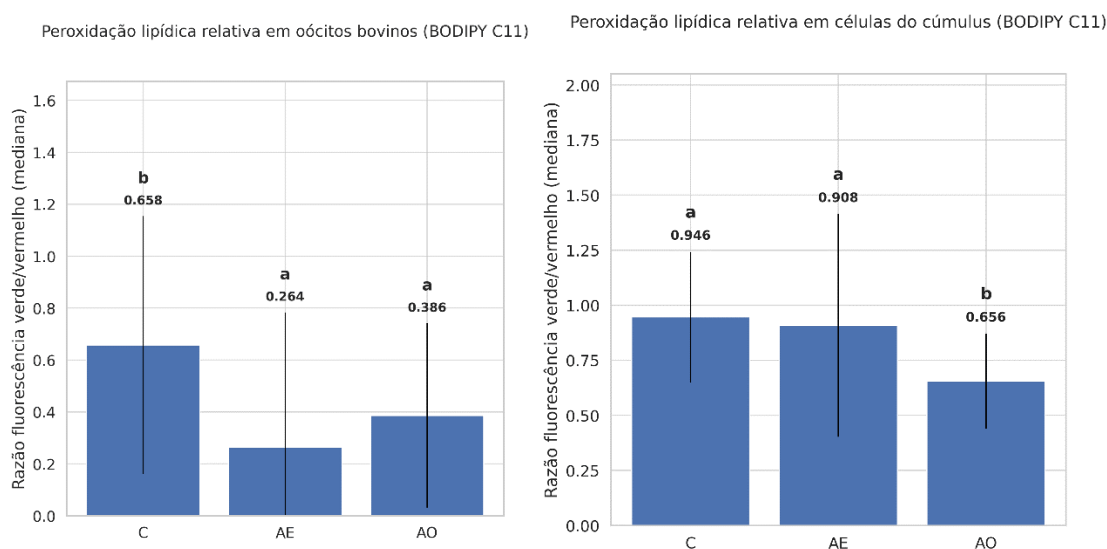


Figura 6 – Peroxidação lipídica (BODIPY C11)

Peroxidação lipídica relativa em células do cúmulus e oócitos bovinos maturados *in vitro* sob diferentes condições de suplementação lipídica, avaliada por fluorescência da sonda BODIPY™ 581/591 C11 (razão fluorescência verde/vermelho). Valores expressos como mediana e desvio-padrão (Oócitos: C (n=69), AE (n=138), AO (n=120); Cúmulus: C (n=223), AE (n=214), AO (n=226)). Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos pelo teste de Dwass–Steel–Critchlow–Fligner após Kruskal–Wallis ($p < 0,05$).

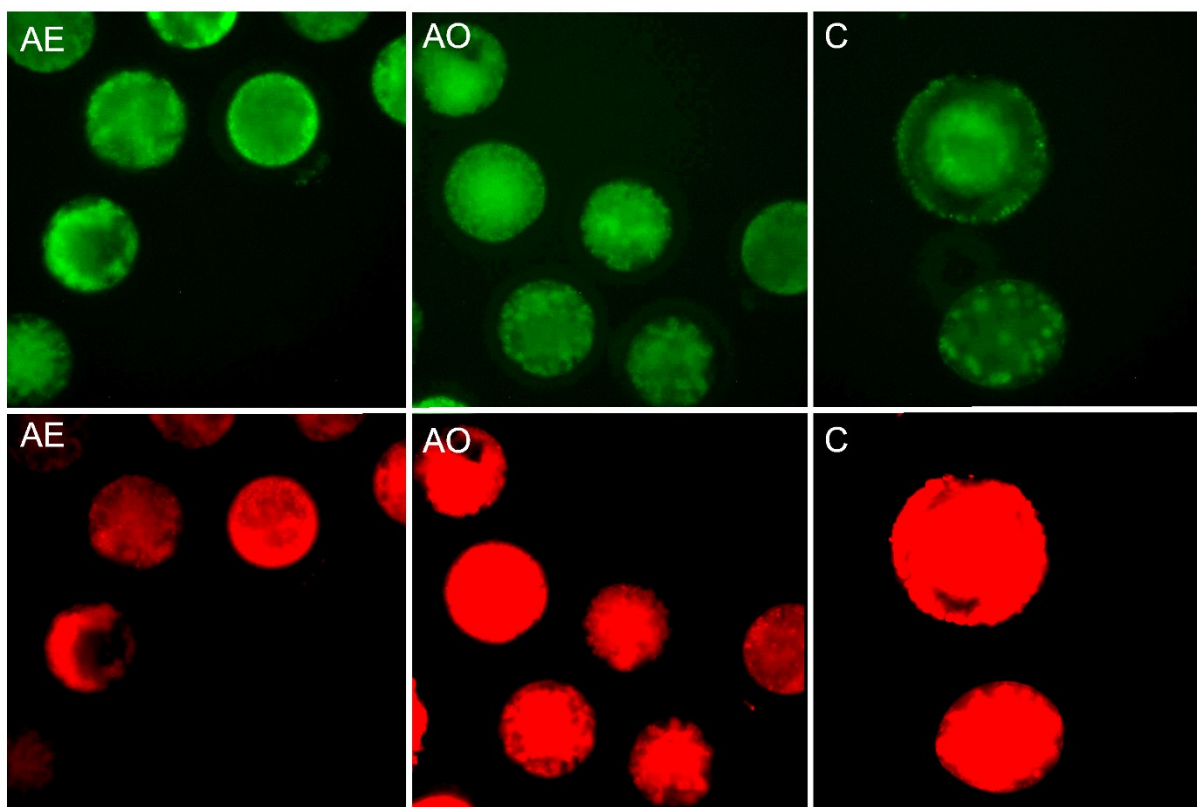


Figura 7 – Peroxidação lipídica em oócitos bovinos

Imagens representativas de oócitos bovinos maturados in vitro, evidenciando peroxidação lipídica medida pela razão de fluorescência verde (lipídios peroxidados) sobre vermelho (lipídios não peroxidados), utilizando a sonda BODIPY™ 581/591 C11, nos grupos Controle (C), Ácido Esteárico (AE) e Ácido Oleico (AO).

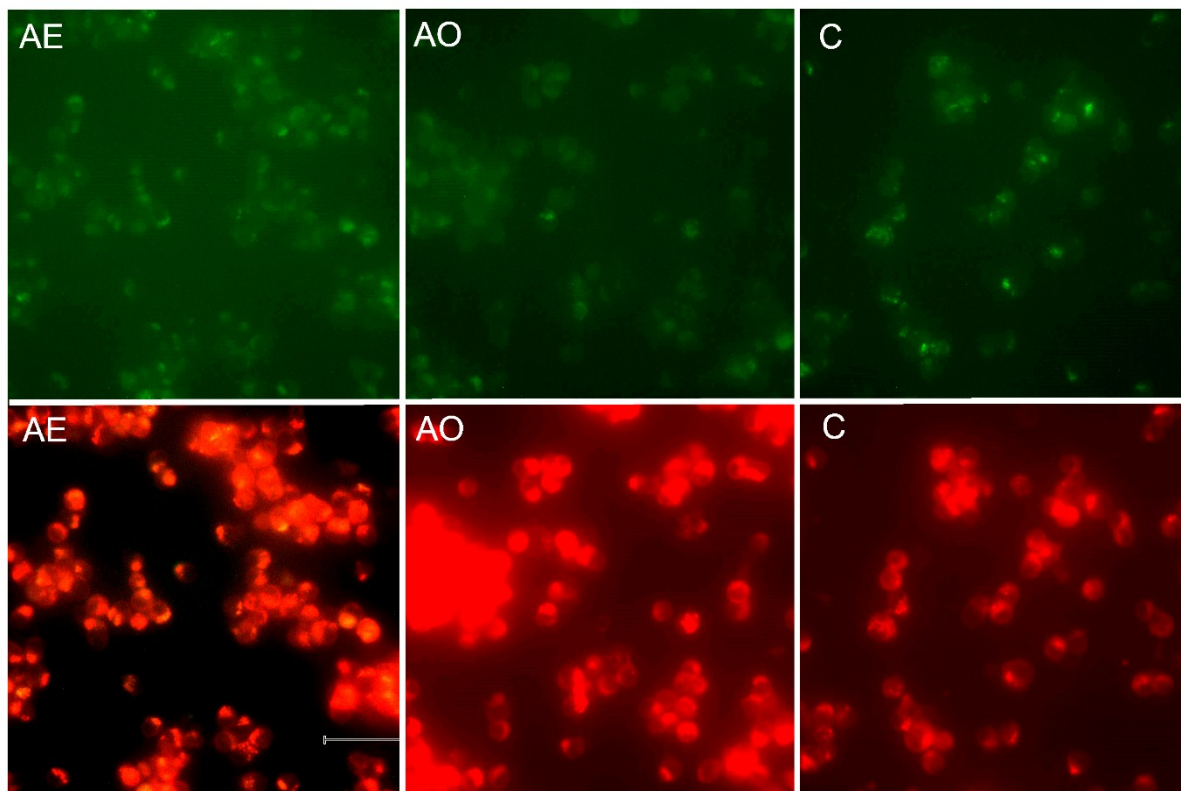


Figura 8 – Peroxidação lipídica em células do cúmulus bovino

Imagens representativas de células do cúmulus bovino maturadas in vitro, evidenciando peroxidação lipídica medida pela razão de fluorescência verde (lipídios peroxidados) sobre vermelho (lipídios totais), utilizando a sonda BODIPY™ 581/591 C11, nos grupos Controle (C), Ácido Esteárico (AE) e Ácido Oleico (AO).

4.4 Atividade da enzima SCD1

A expressão da enzima SCD1 foi analisada em diferentes grupos de oócitos bovinos (controle, esteárico, imaturos e oleico). O grupo ácido esteárico se destacou, sendo o grupo com maior diferença estatística com os demais, sendo a ordem, imaturos ($P < 0,001$), controle ($P = 0,01$) e oleico ($P = 0,025$). (Figuras 9 e 10).

Quando analisado o BODIPY, o grupo de oócitos imaturos apresentou valores superiores ao grupo controle ($P = 0,003$), enquanto o grupo esteárico exibiu valores maiores em relação ao grupo de oócitos imaturos ($P = 0,030$). Por outro lado, o grupo oleico apresentou valores 32% inferiores ao grupo imaturos ($P = 0,004$) (Figuras 9 e

10).

Expressão da enzima SCD1 em complexos cúmulus oophorus (A555)

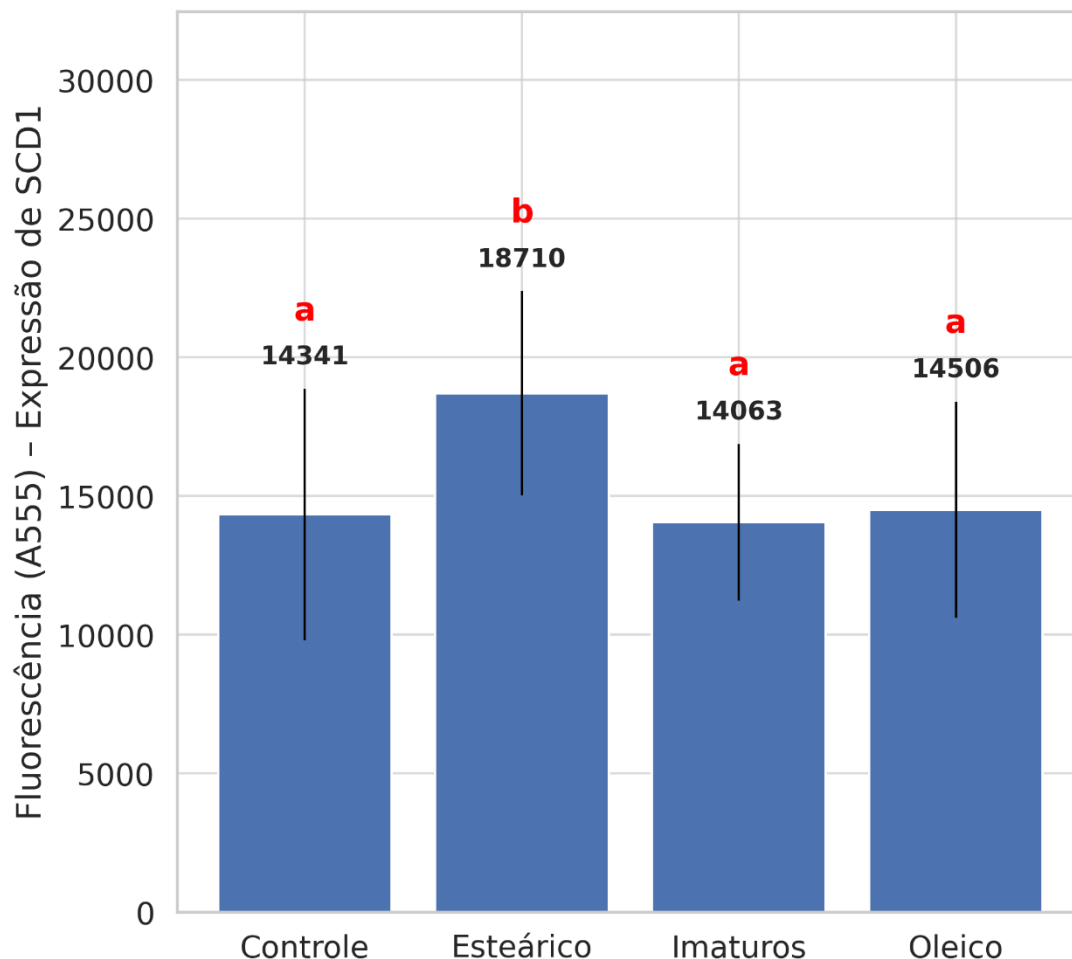


Figura 9 – Expressão da enzima SCD1 (A555)

Expressão da enzima esteroil-CoA dessaturase 1 (SCD1) em complexos cúmulus oophorus bovinos maturados in vitro sob diferentes condições de suplementação lipídica, mensurada por fluorescência (A555). Valores expressos como mediana e desvio-padrão (Controle (n=55), Esteárico (n=51), Imaturos (n=35), Oleico (n=66)). Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos pelo teste de Dwass–Steel–Critchlow–Fligner após Kruskal–Wallis ($p < 0,05$).

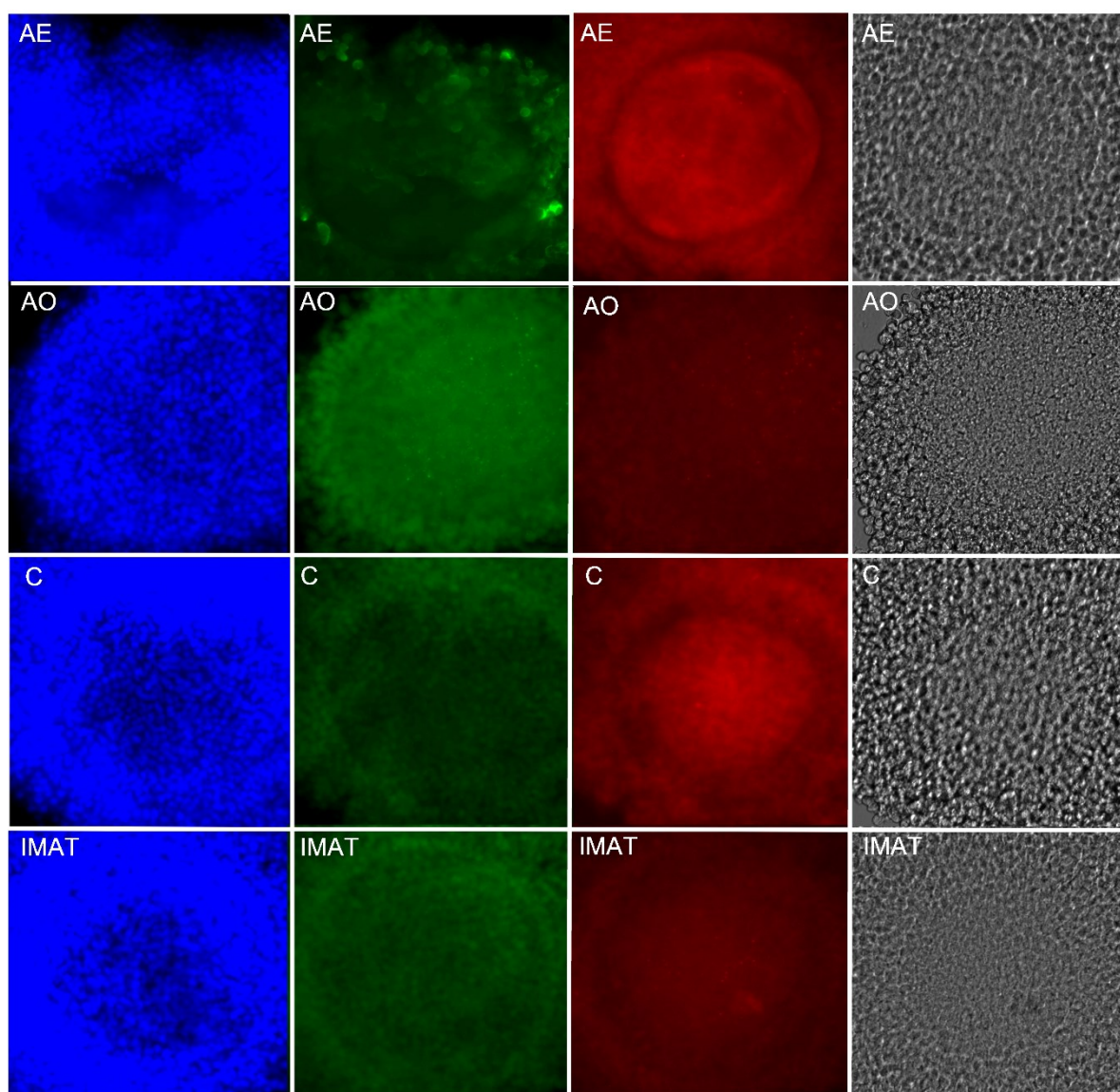


Figura 10 - Expressão da enzima SCD1 em complexos cúmulus-oócito bovinos

Imagens representativas de complexos cúmulus-oócito bovinos, mostrando marcação de núcleos (azul, Hoechst 33342), lipídios totais (verde, sonda BODIPY®), e expressão da enzima estearoil-CoA dessaturase 1 (SCD1) (vermelho, anticorpo anti-SCD1 conjugado), obtidas por microscopia de fluorescência. Apresenta-se também a imagem de contraste de fase para cada grupo experimental (Controle – C, Ácido Esteárico – AE, Imaturos – IMAT e Ácido Oleico – AO).

5.0 DISCUSSÃO

5.1 Atividade Mitocondrial

No presente estudo, os valores de atividade mitocondrial nos oócitos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos analisados. Resultados

semelhantes foram descritos na literatura, em que modificações no ambiente de maturação *in vitro*, como a adição de antioxidantes, nem sempre resultam em aumento expressivo na atividade mitocondrial dos oócitos, mas podem influenciar outros aspectos da competência oocitária (Zheng et al., 2023; Yin et al., 2023). A atividade mitocondrial é um dos principais indicadores da qualidade oocitária e do potencial de desenvolvimento embrionário, sendo essencial para o fornecimento de ATP e a regulação do metabolismo celular (Kirillova et al., 2021).

Apesar de não diferirem nos oócitos dos três grupos experimentais, os valores de atividade mitocondrial nas células do cumulus apresentaram variações expressivas entre os grupos. O grupo oleico apresentou aumento significativo na atividade mitocondrial em comparação com os grupos controle e esteárico, indicando possível efeito da intervenção sobre a funcionalidade mitocondrial das células do cumulus. Essas células desempenham papel crucial no suporte metabólico dos oócitos, sendo responsáveis pelo fornecimento de substratos energéticos e pela regulação da homeostase redox (McKeegan et al., 2021). Dessa forma, o aumento da atividade mitocondrial nas células do cumulus do grupo AO pode indicar a maior capacidade de suporte ao metabolismo oocitário, mesmo que isso não tenha se refletido diretamente nos valores de Mitotracker dos oócitos (Figura 11).

Estudos prévios demonstram que a modulação da atividade mitocondrial nas células do cumulus pode impactar a qualidade oocitária e a competência de desenvolvimento embrionário (Hashimoto et al., 2025). Em particular, a suplementação de precursores mitocondriais, como a nicotinamida mononucleotídeo (NMN), foi associada à melhor função mitocondrial das células do cumulus e à otimização das condições de maturação oocitária (Rodríguez-Nuevo et al., 2022). Além disso, a influência do estresse oxidativo sobre a função mitocondrial também pode ser um fator relevante. Trabalhos anteriores sugerem que a exposição a altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode comprometer a atividade mitocondrial oocitária, enquanto estratégias antioxidantes podem atenuar esses efeitos, principalmente nas células do cumulus (Zheng et al., 2023; Yin et al., 2023).

A ausência de diferenças estatísticas nos oócitos pode estar associada à regulação compensatória do metabolismo energético. Segundo Rodríguez-Nuevo et al. (2022), oócitos possuem mecanismos de adaptação que permitem manter sua

atividade mitocondrial relativamente estável, mesmo diante de variações nas células adjacentes.

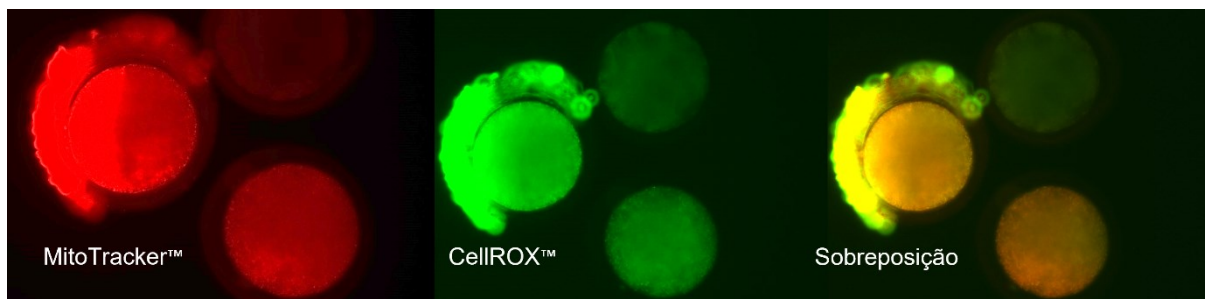


Figura 11 – Canais de fluorescência de MitoTracker® e CellROX® em oócitos bovinos

Imagem de fluorescência de oócitos bovinos mostrando separadamente o canal vermelho (MitoTracker®), o canal verde (CellROX®) e a sobreposição dos canais. As imagens foram adquiridas por microscopia de fluorescência, permitindo a visualização simultânea da atividade mitocondrial e do estresse oxidativo.

5.2 Estresse oxidativo

A análise do estresse oxidativo nos oócitos, utilizando a sonda CellROX, revelou não diferença significativa entre os grupos avaliados os valores médios indicam que o grupo controle apresentou nível de estresse oxidativo 20% superior ao grupo tratado com ácido oleico e 19% superior ao grupo tratado com ácido esteárico (AE). Esses achados corroboram estudos que apontam o papel modulador dos ácidos graxos sobre o metabolismo lipídico e a homeostase redox, mas também destacam a complexidade dos mecanismos envolvidos na resposta antioxidante oocitária (Silva & Silva, 2023).

A relação entre a modulação lipídica e o estresse oxidativo nos oócitos tem sido amplamente estudada, e evidências indicam que os ácidos graxos insaturados, como o ácido oleico, possuem efeitos protetores ao reduzir a peroxidação lipídica e favorecer a homeostase antioxidante (Lin & Wang, 2020). No entanto, a ausência de significância estatística nas comparações múltiplas do presente estudo pode indicar que os efeitos do ácido oleico e do ácido esteárico não foram suficientemente intensos para impactar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) de forma expressiva.

Nas células do cumulus, a análise de estresse oxidativo não revelou diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais, com variações inferiores a 3%

entre as medianas dos grupos AE, AO e C. Estudos indicam que as células do cumulus desempenham papel essencial na proteção dos oócitos contra o estresse oxidativo, agindo como um sistema tamponante e regulando a homeostase redox do microambiente folicular (Barrozo et al., 2021). A estabilidade observada entre os grupos pode ser explicada pelo fato de que essas células expressam elevadas concentrações de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPX) e catalase (CAT), além de possuírem metabolismo ativo que contribui para a neutralização das EROs (Silva & Silva, 2023).

Outro aspecto relevante é que a resposta ao estresse oxidativo nos oócitos e no cumulus pode ser modulada por vias metabólicas mitocondriais, que influenciam diretamente a produção e a neutralização das EROs (Figura 6) (Wang et al., 2023). A atividade mitocondrial desempenha papel central na geração de ATP e no metabolismo lipídico, sendo um dos principais reguladores da homeostase oxidativa durante a maturação oocitária (Kirillova et al., 2021).

5.3 Peroxidação Lipídica

A análise da peroxidação lipídica nos oócitos, utilizando a razão da sonda BODIPY C11, revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados, sugerindo que a composição lipídica do meio influencia diretamente a homeostase redox dessas células. O grupo tratado com ácido esteárico (AE) apresentou menor peroxidação lipídica, enquanto o grupo controle (C) exibiu os maiores valores, com diferença de 149% em relação ao AE. Esses achados indicam que a presença do ácido esteárico pode exercer efeito protetor contra a oxidação lipídica nos oócitos, possivelmente por modular a fluidez da membrana e reduzir a suscetibilidade das células ao ataque de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Keane & Ealy, 2024). Estudos demonstram que ácidos graxos saturados, como o esteárico, podem ser convertidos em monoinsaturados pela ação da esteroil-CoA dessaturase 1 (SCD1), contribuindo para a estabilidade estrutural das membranas e mitigando o impacto do estresse oxidativo (Melo-Sterza & Poehland, 2021).

Por outro lado, o grupo tratado com ácido oleico (AO) apresentou valores intermediários de peroxidação lipídica nos oócitos, 46% superiores ao grupo AE, mas

sem significância estatística. O ácido oleico, por ser um ácido graxo monoinsaturado, está associado a efeitos protetores contra o estresse oxidativo, pois melhora a fluidez da membrana celular e regula a homeostase lipídica mitocondrial (Cao et al., 2022). No entanto, a menor redução da peroxidação lipídica observada no grupo AO, em comparação ao grupo AE, pode indicar que a conversão de ácidos graxos saturados em insaturados, catalisada pela SCD1, desempenha papel ainda mais relevante na proteção contra a oxidação lipídica do que a simples presença de ácidos graxos insaturados no meio (Gao et al., 2023). Além disso, a atividade mitocondrial é um fator crucial na geração de EROs, e o metabolismo diferencial entre os grupos pode ter influenciado os níveis de peroxidação lipídica observados (Zheng et al., 2023).

Na análise das células do cumulus, a razão entre os canais verde e vermelho do BODIPY C11 também apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. O grupo AO exibiu valores 31% inferiores ao grupo AE e ao grupo C, indicando reduzida peroxidação lipídica no cumulus das células tratadas com ácido oleico (Figura 12). Esse achado reforça a hipótese de que o ácido oleico pode atuar como regulador da homeostase lipídica e da resposta antioxidante no ambiente oocitário (Wang et al., 2021).

A presença de ácidos graxos monoinsaturados tem sido associada à maior resistência das células ao estresse oxidativo, promovendo a ativação de mecanismos antioxidantes endógenos, como a glutathione peroxidase (GPX4) e a superóxido dismutase (SOD) (Cao et al., 2022). Além disso, a redução da peroxidação lipídica no cumulus do grupo AO pode indicar maior eficiência na comunicação metabólica entre as células do cumulus e os oócitos, favorecendo a maturação e a qualidade oocitária (Keane & Ealy, 2024).

Por outro lado, a ausência de diferenças significativas entre os grupos AE e C na peroxidação lipídica do cumulus sugere que o efeito protetor do ácido esteárico pode ser mais pronunciado nos oócitos do que nas células do cumulus. Esse resultado pode estar relacionado ao papel das células do cumulus como barreira protetora contra o estresse oxidativo, atuando como um sistema tamponante que minimiza a exposição dos oócitos a altos níveis de EROs (Melo-Sterza & Poehland, 2021). No entanto, a diferença observada entre os grupos na peroxidação lipídica dos oócitos

indica que o metabolismo lipídico intrínseco dessas células pode ser mais sensível às alterações no perfil de ácidos graxos do meio de cultivo.

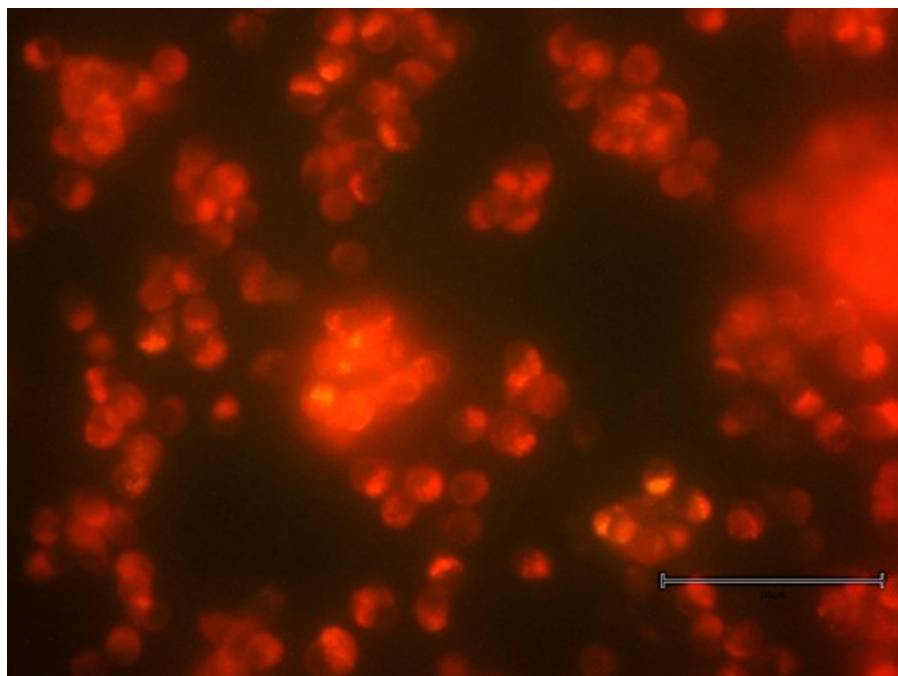


Figura 12 – Imagem de fluorescência de BODIPY™ 581/591 C11 em células do cúmulus

Imagem representativa de células do cúmulus bovino mostrando sobreposição dos canais verde e vermelho da sonda BODIPY™ 581/591 C11, que indicam, respectivamente, lipídios peroxidados e lipídios não peroxidados.

5.4 Atividade da enzima SCD1

A expressão da enzima estearoil-CoA dessaturase 1 (SCD1) nos diferentes grupos de oócitos bovinos revelou diferenças estatisticamente significativas, destacando o impacto do ambiente lipídico sobre a regulação dessa enzima. O grupo tratado com ácido esteárico apresentou a maior expressão de SCD1 em comparação com os demais grupos, sugerindo que esse ácido graxo saturado pode atuar como indutor da atividade da enzima. Esses achados corroboram estudos anteriores que indicam que a SCD1 desempenha papel crucial na homeostase lipídica dos oócitos, sendo responsável pela conversão de ácidos graxos saturados, como o esteárico, em monoinsaturados, como o oleico (Niu et al., 2023). O aumento expressivo da SCD1 no grupo esteárico pode estar associado a um mecanismo compensatório da célula

para manter a fluidez da membrana plasmática, uma vez que os ácidos graxos saturados tendem a torna-la rígida (Kong & Gao, 2024).

A diferença significativa entre os grupos tratados com ácido esteárico e oleico reforça a hipótese de que a SCD1 responde diferencialmente aos tipos de ácidos graxos disponíveis no ambiente oocitário. Enquanto o ácido esteárico induziu à maior expressão da enzima, o ácido oleico, principal produto da SCD1, exibiu menor taxa de expressão quando comparado ao grupo imaturos e ao grupo controle. Essa resposta pode estar relacionada ao feedback negativo da enzima, em que o acúmulo de produtos finais, como os ácidos graxos monoinsaturados, inibe sua própria síntese (Niu et al., 2023). Esse fenômeno já foi descrito em estudos que demonstram que o metabolismo lipídico é finamente regulado durante a maturação oocitária, sendo a SCD1 um dos principais moduladores da composição lipídica dos oócitos (Sun et al., 2024).

Os resultados da análise de BODIPY também fornecem evidências relevantes sobre o metabolismo lipídico nos diferentes grupos de oócitos. O maior acúmulo de lipídios observado nos oócitos imaturos em relação ao grupo controle sugere que os lipídios são armazenados em gotículas lipídicas antes da maturação, servindo como uma reserva energética para o desenvolvimento embrionário inicial (Kong & Gao, 2024). Além disso, a elevação dos níveis de BODIPY no grupo tratado com ácido esteárico pode indicar que esse ácido graxo favorece o acúmulo de lipídios nos oócitos, possivelmente devido ao aumento na conversão de ácidos graxos saturados em monoinsaturados pela ação da SCD1. Esse efeito é condizente com estudos que demonstram que a SCD1 é essencial para a homeostase lipídica e que sua inibição leva ao acúmulo de ácidos graxos saturados, impactando negativamente o desenvolvimento embrionário (Niu et al., 2023).

Por outro lado, o grupo tratado com ácido oleico apresentou níveis de lipídeos significativamente menores em relação ao grupo imaturos, sugerindo que a presença desse ácido graxo favorece a mobilização e a utilização de lipídios, reduzindo seu armazenamento nas gotículas lipídicas. Estudos prévios indicam que o ácido oleico pode melhorar a qualidade oocitária ao reduzir o estresse lipotóxico e favorecer a maturação (Xuan et al., 2022). Dessa forma, a menor taxa de lipídeos observada no grupo oleico pode indicar um metabolismo lipídico mais eficiente, com maior

mobilização de ácidos graxos para a produção de energia, o que pode ser benéfico para a competência do oócito em se desenvolver até os estágios iniciais da embriogênese.

6.0 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a suplementação com ácido oleico durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos pode promover benefícios significativos para o microambiente folicular, especialmente ao melhorar a atividade mitocondrial das células do cumulus, reduzir a peroxidação lipídica e modular o estresse oxidativo.

Além disso, a utilização de BSA em conjunto com ácidos graxos como alternativa ao soro fetal bovino apresenta-se como uma estratégia viável para aprimorar os protocolos de maturação *in vitro*, reduzindo variações associadas a componentes biológicos indefinidos e possivelmente tornando a produção de embriões mais eficiente e padronizada.

Conclui-se, portanto, que o ácido oleico é um suplemento promissor para a maturação oocitária em bovinos, com potencial para melhorar a eficiência da produção *in vitro* de embriões. No entanto, estudos futuros devem explorar seu impacto no desenvolvimento embrionário e na viabilidade dos embriões a longo prazo, visando validar seu uso em larga escala e compreender melhor os mecanismos pelos quais ele influencia a qualidade e o sucesso reprodutivo dos oócitos bovinos.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROZO, L. G. et al. *N-acetyl-cysteine and the control of oxidative stress during in vitro ovarian follicle growth, oocyte maturation, embryo development and cryopreservation. Animal Reproduction Science*, v. 231, ago. 2021.

BEZERRA, B. M. O. et al. *Supplementation with oils rich in polyunsaturated fatty acids in the diet of pigs in the nursery phase: Effects on performance, inflammatory response, lipid profile and oxidative status. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 72, n. 3, p. 1009–1016, 1 maio 2020.

BOGATYREVA, A. I. et al. *Mitochondrial DNA copy number in patients with systemic sclerosis. Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 10, 2023.

BROWN, K. et al. *SIRT3 Reverses Aging-Associated Degeneration. Cell Reports*, v. 3, n. 2, p. 319–327, 2013.

CAMPOS, C. O. et al. *Influência da interação entre o oócito e as células da granulosa nos resultados dos procedimentos de reprodução assistida. FEMINA*, v. 39, p. 207–216, abr. 2011.

CANUTO, L. P.; COLLARES BUZATO, C. B. *Efeito in vitro de Altas Concentrações de Ácidos Graxos sobre a Barreira Epitelial Intestinal em Células Caco-2*. [s.l: s.n.], 2015.

CAO, B. et al. *Oxidative Stress and Oocyte Cryopreservation: Recent Advances in Mitigation Strategies Involving Antioxidants. Cells MDPI*, 1 nov. 2022.

CARRO, M. et al. *Linoleic acid stimulates neutral lipid accumulation in lipid droplets of maturing bovine oocytes. Theriogenology*, v. 79, n. 4, p. 687–694, 1 mar. 2013.

CHENG, K. Y. et al. *MnTM-4-PyP Modulates Endogenous Antioxidant Responses and Protects Primary Cortical Neurons against Oxidative Stress. CNS Neuroscience and Therapeutics*, v. 21, n. 5, p. 435–445, 1 maio 2015.

DADARWAL, D. et al. *Effect of maternal age on ATP content and distribution of mitochondria in bovine oocytes. PLoS ONE*, v. 19, n. 4, 1 abr. 2024.

DE OLIVEIRA IZAR, M. C. et al. *Position statement on fat consumption and cardiovascular health-2021. Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 116, n. 1, p. 160–212, 2021.

DUNNING, K. R.; RUSSELL, D. L.; ROBKER, R. L. *Lipids and oocyte developmental competence: The role of fatty acids and β -oxidation*. ReproductionBioScientifica Ltd., , 1 jul. 2014.

FERREIRA, A. F. et al. *Does supplementation with mitochondria improve oocyte competence? A systematic review. Reproduction*, p. 161–269, 2021.

GAO, L. et al. *Glycine regulates lipid peroxidation promoting porcine oocyte maturation and early embryonic development. Journal of Animal Science*, v. 101, 2023.

GOTTARDI, F. P. et al. *Efeito das células do cumulus e cisteamina durante o cultivo de maturação in vitro de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da competência para desenvolvimento embrionário*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 64, p. 245–252, 2012.

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, p. 1616–1624, 2013.

HASHIMOTO, S. et al. *Nicotinamide mononucleotide boosts the development of bovine oocyte by enhancing mitochondrial function and reducing chromosome lagging*. *Scientific Reports*, v. 15, n. 1, 1 dez. 2025.

KEANE, J. A.; EALY, A. 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 MDPI*, 1 jan. 2024.

KIM, J. Y. et al. *Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen–thawed immature and in vitromatured bovine oocytes*. *Journals of Reproduction and Fertility*, v. 122, p. 131–138, 2001.

KIRILLOVA, A. et al. *The role of mitochondria in oocyte maturation*. *Cells MDPI*, 1 set. 2021.

KONG, Q.; GAO, S. *Lipidomic remodeling during mammalian preimplantation embryonic development*. *Life Metabolism*, v. 3, n. 2, 1 abr. 2024.

KURZELLA, J. et al. *The mitochondrial respiration signature of the bovine blastocyst reflects both environmental conditions of development as well as embryo quality*. *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, 1 dez. 2023.

LAUNAY, N. et al. *RINT1 deficiency disrupts lipid metabolism and underlies a complex hereditary spastic paraplegia*. *Journal of Clinical Investigation*, v. 133, n. 14, 17 jul. 2023.

LEITE, A. C. et al. *Efeito da adição do ácido linoleico conjugado no cultivo in vitro de embriões F1 Holandês X Zebu na sobrevivência pós-vitrificação*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2017.

MELO-STERZA, F. DE A.; POEHLAND, R. *Lipid metabolism in bovine oocytes and early embryos under in vivo, in vitro, and stress conditions*. *International Journal of Molecular Sciences MDPI AG*, abr. 2021.

NIU, H. et al. *SCD1 deficiency in early embryos affects blastocyst ICM formation through RPs-Mdm2-p53 pathway*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 2, 1 jan. 2023a.

NIU, H. et al. *Dynamic role of Scd1 gene during mouse oocyte growth and maturation*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 247, 30 ago. 2023b.

PRATES, E. G.; NUNES, J. T.; PEREIRA, R. M. *A role of lipid metabolism during cumulus-oocyte complex maturation: Impact of lipid modulators to improve embryo production*. Mediators of Inflammation Hindawi Publishing Corporation, 2014.

PURIE, G. et al. *Effects of fetal bovine serum and estrus buffalo serum on maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes in vitro*. *Veterinary World*, v. 8, n. 2, p. 143–146, 2015.

RODRÍGUEZ-NUEVO, A. et al. *Oocytes maintain ROS-free mitochondrial metabolism by suppressing complex I*. *Nature*, v. 607, n. 7920, p. 756–761, 28 jul. 2022.

SUN, Q. et al. *SCD1 is the critical signaling hub to mediate metabolic diseases: Mechanism and the development of its inhibitors*. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 1 jan. 2024.

VIREQUE, A. A. et al. *MALDI mass spectrometry reveals that cumulus cells modulate the lipid profile of in vitro-matured bovine oocytes*. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, v. 63, n. 2, p. 86–99, 4 mar. 2017a.

XUAN, Y. et al. *SCD1/FADS2 fatty acid desaturases equipose lipid metabolic activity and redox-driven ferroptosis in ascites-derived ovarian cancer cells*. *Theranostics*, v. 12, n. 8, p. 3534–3552, 2022.

ZHENG, L. et al. *Leonurine improves bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development by reducing oxidative stress and improving mitochondrial function*. *Theriogenology*, v. 199, p. 11–18, 15 mar. 2023.