

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**WASIM AL SHEBLI**

**EFEITO DA METFORMINA NA COMPETÊNCIA OOCITÁRIA BOVINA E  
VIABILIDADE EMBRIONÁRIA PÓS- CRIOPRESERVAÇÃO**

**Viçosa-minas gerais**

**2024**

**WASIM AL SHEBLI**

**EFEITO DA METFORMINA NA COMPETÊNCIA OOCITÁRIA BOVINA E  
VIABILIDADE EMBRIONÁRIA PÓS- CRIOPRESERVAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Luiz Sérgio de Almeida Camargo

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A316e  
2024 Al Shebli, Wasim, 1981-  
Efeito da metformina na competência oocitária bovina e  
viabilidade embrionária pós-criopreservação / Wasim Al Shebli.  
– Viçosa, MG, 2024.  
1 tese eletrônica (91 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Luiz Sérgio de Almeida Camargo.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Veterinária, 2024.

Referências bibliográficas: f. 61-87.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.698>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bovinos - Reprodução. 2. Blastocisto - Criopreservação.  
3. Fertilização in vitro. 4. Metformina. 5. Lipídios - Peroxidação.  
I. . II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.20892014467

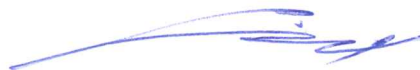
**WASIM AL SHEBLI**

**EFEITO DA METFORMINA NA COMPETÊNCIA OOCITÁRIA BOVINA E  
POSTERIOR VIABILIDADE EMBRIONÁRIA PÓS- CRIOPRESERVAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de PósGraduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada: 20 de Setembro de 2024

Assentimento:



---

Wasim Al Shebli

Autor



---

Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Orientador

## **Dedicatória**

**Dedico este trabalho ao Deus, à  
minha mãe, ao meu pai, à minha  
família, ao Brasil, à Minas Gerais e  
aos meus professores e amigos...**

## **Agradecimentos**

A Deus, o Mais Misericordioso por me dar a força e estar sempre comigo...

A minha mãe pelas orações e pelo carinho e cuidado para me tornar a pessoa que eu sou...

Ao meu pai por todo esforço e sacrifício para me colocar no caminho da vida....

As minhas irmãs Rasha e Rana pelo carinho e suporte...

Aos meus irmãos Tamem e Abodi pelo suporte...

A minha vida Lídia por ficar sempre do meu lado e por todo cuidado comigo...

Ao meu orientador, Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo pela orientação e por dar exemplo de dedicação, paciência e profundidade nos trabalhos científicos, para eu seguir...

A Dra. Naiara Zoccal Saraiva pelo suporte, apoio, aprendizagem e contribuição no sucesso deste trabalho; me guio com seus trabalhos e métodos...

A Dra. Clara Slade Oliveira pela colaboração, ajuda, aprendizagem na aplicação da teoria na prática e contribuição no sucesso deste trabalho...

A Dra. Carolina Capobiango Romano Quintão pelo apoio e colaboração e pela contribuição no sucesso deste trabalho...

A Professora Simone Eliza Facioni Guimarães pelo suporte e por acompanhar o sucesso deste trabalho nas bancas examinadoras desde o processo seletivo até a defesa da Tese...

Ao Professor José Domingos Guimarães pelo suporte e pela aprendizagem nas disciplinas e por acompanhar o sucesso deste trabalho na qualificação e na defesa da Tese...

Ao Dr. Hyago Passe Pereira pelo suporte e pela boa amizade...

Ao Dr. Luiz Gustavo Sequeira pela boa amizade e pela colaboração...

Ao Professor Jose Nélio de Sousa Sales pela aprendizagem e pela boa amizade...

A Sra. Maria Angélica Quintão Barros e o Dr. João Nilson Pinto de Barros pelo apoio, suporte e contribuição...

A Querida Sra. Rosinéia Cunha pelo suporte, apoio e ajuda...muito obrigado...

Ao Sr. Joel Vianello e Sr. Myro pela ajuda e pelas boas amizades...

A Professora Adriana da Silva do Departamento de Letras na UFV pela amizade e pela aprendizagem em idioma português...

Aos amigos (pela ordem alfabética) Alexandre Marcos de Melo (o parceiro), André Lopes, Diana Rangel Lemos, Luiza Bastos Guimarães, Victor Felipe Sophia da Costa Neves e Yuri Sabbage pela colaboração e boas amizades...

Não esqueço também de agradecer o querido Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu que me colocou no caminho da vida acadêmica...

A Universidade Federal de Viçosa (UFV), especialmente o Departamento da Medicina Veterinária por me dar uma chance de construir a minha vida acadêmica...

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) - Gado de Leite e sua equipe por suportar o trabalho...

Ao Laboratório da Reprodução Animal, Embrapa Gado de Leite....

Ao laboratório da Gênese Biotecnologia em Reprodução Animal Ltda pela contribuição...

Agradecimento especial ao Brasil (meu país) por me receber como um refugiado e abrir as portas dos melhores Institutos da Ciência e Pesquisa (UFV e Embrapa) no seu território e no mundo para que eu comece uma nova vida de sucesso....

Obrigado do Coração...

Agradeço o lindo estado de Minas Gerais e o povo mineiro...

A CAPES pela bolsa... O CNPq e a FAPEMIG pelo suporte...

## Epígrafe

*“Deixe-me contar o segredo que me levou ao meu objetivo. A Minha força reside unicamente na minha tenacidade”. (Louis Pasteur)*

## RESUMO

Shebli, Wasim, Al, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2024. **Efeito da metformina na competência oocitária bovina e viabilidade embrionária pós-criopreservação.** Orientador: Luiz Sérgio de Almeida Camargo.

A metformina (MT), a qual atenua a liberação dos radicais livres, e a absorção e a condensação dos lipídios, pode melhorar os resultados da produção *in vitro* e a criotolerância de blastocistos. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito de concentrações da MT entre 0,05 (MT<sub>1</sub>), 0,1 (MT<sub>2</sub>) e 0,2 (MT<sub>3</sub>) mM adicionadas durante a pré-maturação e a maturação *in vitro*-MIV nos experimentos (EXPs) 1 e 2, e o cultivo *in vitro*-CIV com renovação do meio (EXP3.1) (50% nos 3<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> dias de cultivo) ou sem renovação (EXP3.2). No EXP4, os oócitos maturaram e os zigotos desenvolveram com 0,1 e 0,05 mM MT nos grupos: MMT<sub>0</sub>+CMT<sub>0</sub>, MMT<sub>0</sub>+CMT<sub>1</sub>, MMT<sub>2</sub>+CMT<sub>0</sub> e MMT<sub>2</sub>+CMT<sub>1</sub>, e o EXP5 comparou a criotolerância entre o controle e MMT<sub>2</sub>+CMT<sub>1</sub>. Os parâmetros avaliados nos blastocistos foram: o número de blastômeros apoptóticos e totais usando o ensaio de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP-digoxigenin nick end-labeling*) e a coloração de DAPI (*4'6-diamidino-2-phenylindole*), respectivamente (EXP2, 3.2 e 5), a área ocupada pelos lipídios e a taxa da peroxidação no EXP4, utilizando a sonda de BODIPY<sup>581/591</sup>C<sub>11</sub> e a re-expansão e a eclosão pós-vitrificação no EXP5. O software utilizado para contar as células e medir a área lipídica e a intensidade da fluorescência foi ImageJ (1.54d; National Institutes of Health, Wisconsin, EUA). A regressão logística (desenvolvimento embrionário e a índice da apoptose), a análise da variância com teste das médias (contagem das células e a oxidação de lipídios) e Qui-quadrado (dados qualitativos) foram os métodos estatísticos utilizados para analisar os dados. Média±EPM representou os resultados e a consideração da diferença significativa foi quando P≤0,05. A MT não afetou (P>0,05) a produção de blastocistos quando adicionada na pré-maturação induzida por 12 horas com 50 µM da butirolactona I (EXP1). No EXP2, a MIV com 0,1 mM MT apresentou as maiores taxa (P<0,05) de blastocisto expandido, número de células e índice da apoptose (27,5±1,8%, 173,77±7 e 33,95±3,76%, respectivamente) do que o controle (18,1±4,8%, 138,33±11,12 e 19,05±2,97%, respectivamente). No EXP3.1, 0,1 mM MT resultou em uma taxa maior (P<0,05) de blastocisto (34,6±4,9%) do que controle (12,2±1,4%). Porém, no EXP3.2, a concentração de 0,05 mM MT resultou na maior proporção (P<0,05) de blastocisto total (60,3±2,5%) entre os grupos e no

controle houve menor índice da apoptose ( $24,5 \pm 2,5\%$ ) ( $P < 0,05$ ) do que nos grupos tratados com 0,1 mM ( $27,9 \pm 1,9\%$ ) e 0,05 mM ( $26,4 \pm 1,9\%$ ) e semelhante ( $P > 0,05$ ) ao 0,2 mM ( $22,9 \pm 2\%$ ). No EXP4, MT não alterou a área de lipídios, mas a oxidação lipídica foi menor ( $P < 0,05$ ) no  $MMT_2 + CMT_1$  ( $48,75 \pm 2,76\%$ ) do que nos  $MMT_0 + CMT_0$  ( $55,99 \pm 1,92\%$ ) e  $MMT_2 + CMT_0$  ( $57,47 \pm 2,35\%$ ) e similar ( $P > 0,05$ ) ao  $MMT_0 + CMT_1$  ( $52,16 \pm 2,67\%$ ). No EXP5, não houve efeito ( $P > 0,05$ ) do tratamento na viabilidade embrionária, mas blastocistos produzidos do  $MMT_2 + CMT_1$  mostrou maior ( $P < 0,05$ ) taxa de eclosão ( $15,93 \pm 9,33\%$ ) do que no controle ( $6,54 \pm 1,58\%$ ) com 24 horas após a devitrificação. Em conclusão, a metformina contribuiu para proteger os lipídios embrionários contra os agentes oxidantes, o que reflete em criotolerância maior após a vitrificação. Contudo, os efeitos no desenvolvimento embrionário dependem da dose e podem ser influenciados pela metodologia de cultivo adotada.

Palavras-chave: Antioxidante. Blastocisto. Peroxidação. Lipídios. Vitrificação.

## ABSTRACT

Shebli, Wasim, Al, D.Sc, Universidade Federal de Viçosa, September. **Metformin effect on bovine oocyte competence and post-cryopreservation embryo viability.**  
Adviser: Luiz Sérgio de Almeida Camargo.

Metformin, which attenuates free radical liberation, and lipids uptake and condensation, can improve *in vitro* blastocyst production and cryotolerance outcomes. The present work aimed to evaluate the effect of MT concentrations among 0.05 (MT<sub>1</sub>), 0.1 (MT<sub>2</sub>) e 0.2 (MT<sub>3</sub>) mM added during pre-maturation and *in vitro* maturation-IVM in experiments (EXPs) 1 and 2, and *in vitro* culture-CIV with renewing the media (EXP3.1) (50% on 3<sup>rd</sup> and 6<sup>th</sup> days of culture) or without renewing (EXP3.2). In EXP4, the oocyte matured and the zygotes developed with 0.1 and 0.05 mM MT in the groups: MMT<sub>0</sub>+CMT<sub>0</sub>, MMT<sub>0</sub>+CMT<sub>1</sub>, MMT<sub>2</sub>+CMT<sub>0</sub> and MMT<sub>2</sub>+CMT<sub>1</sub>, and EXP5 compared the cryotolerance between the control and MMT<sub>2</sub>+CMT<sub>1</sub>. The evaluated parameters in blastocysts were: apoptotic and total blastomeres number using TUNEL assay (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP-digoxigenin nick end-labeling) and DAPI staining (4'6-diamidino-2-phenylindole), respectively (EXP2, 3.2 e 5), lipids occupied area and peroxidation rate in EXP4, utilizing BODIPY<sup>581/591</sup>C<sub>11</sub> probe and post-vitrification re-expansion and hatching in EXP5. The utilized software to count the cells and measure lipid area and florescence intensity was ImageJ (1.54d; National Institutes of Health, Wisconsin, USA). Logistic regression (embryo development and apoptosis index), variance analysis with means test (cell count and lipids oxidation) and Chi-square (qualitative data) were the utilized statistical methods for analyzing the data. Mean±SEM represented the results and the consideration of significant difference was when P≤0.05. MT did not affect (P>0.05) blastocyst production when added in pre-maturation induced for 12 h with 50 µM of butyrolactone I (EXP1). In EXP2, IVM with 0.1 mM MT presented the highest (P<0.05) expanded blastocyst rate, cell number and apoptosis index (27.5±1.8%, 173.77±7 e 33.95±3.76%, respectively) than control (18.1±4.8%, 138.33±11.12 e 19.05±2.97%, respectively). In EXP3.1, 0.1 mM MT resulted in a higher (P<0.05) blastocyst rate (34.6±4.9%) than control (12.2±1.4%). However, in EXP3.2, the concentration of 0.05 mM MT resulted in the higher (P<0.05) total blastocyst proportion (60.3±2.5%) among the groups and in the control there was lower apoptosis index (24.5±2.5%) (P<0.05) than treated groups with 0.1 mM (27.9±1.9%) and 0.05 mM (26.4±1.9%) and similar (P>0.05) to 0.2 mM

(22.9±2%). In EXP4, MT did not alter lipids area, but lipid peroxidation was lower ( $P>0.05$ ) in  $MMT_2+CMT_1$  (48.75±2.76%) than in  $MMT_0+CMT_0$  (55.99±1.92%) and  $MMT_2+CMT_0$  (57.47±2.35%) and similar ( $P>0.05$ ) to  $MMT_0+CMT_1$  (52.16±2.67%). In EXP5, there was no effect ( $P>0.05$ ) of the treatment on embryo viability, but blastocysts produced from  $MMT_2+CMT_1$  showed higher ( $P<0.05$ ) hatching rate (15.93±9.33%) than in control (6.54±1.58%) within 24 h post desvitrification. In conclusion, metformin contributed to protect embryo lipids against oxidant agents, which reflects in higher cryotolerance after vitrification. Nevertheless, the effects in embryo development depend on the dose and can be influenced by the adapted culture methodology.

Key-words: Antioxidant. Blastocyst. Peroxidation. Lipids. Vitrification.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Lipogênese e formação das gotas lipídicas.....	26
Figura 2- A classificação morfológica de estágios de blastocistos 168 horas após a fecundação.....	34
Figura 3- Blastocistos com a coloração DAPI e TUNEL.....	37
Figura 4- A área e a oxidação dos lipídios em embriões bovinos.....	39
Figura 5- Células coradas para avaliar a viabilidade de blastocistos produzidos de oócitos maturados com metformina.....	44
Figura 6- Blastômeros totais e apoptóticos em blastocistos produzidos de meio de cultivo acrescentado de metformina.....	48
Figura 7- Área e oxidação lipídicas em embriões bovinos.....	53
Figura 8- Blastocistos excluídos da vitrificação e corados com DAPI e TUNEL.....	56
Figura 9- O desenvolvimento embrionário pós-criopreservação.....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Experimentos (EXP) com metformina (MT) e parâmetros avaliados.....	32
Tabela 2- Desenvolvimento pós-fecundação de oócitos submetidos ao bloqueio da meiose por 24 horas com metformina.....	40
Tabela 3- Efeito da adição da metformina durante a pré-maturação por 12 horas na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	42
Tabela 4- A produção de embriões desenvolvidos de oócitos bovinos maturados com três concentrações da metformina.....	43
Tabela 5- Efeito de suplemento da metformina no meio da maturação na viabilidade do embriões produzidos.....	43
Tabela 6- Produção de embriões bovinos desenvolvidos no meio de cultivo renovado nos 3º e 6º dias e suplementado com metformina.....	46
Tabela 7- O desenvolvimento de zigotos cultivados com metformina para estruturas embrionárias 168 horas após a fecundação <i>in vitro</i> .....	47
Tabela 8- A ocorrência da apoptose em blastocistos produzidos de embriões cultivados com a metformina.....	47
Tabela 9- Efeito da metformina adicionada durante o cultivo no desenvolvimento embrionário para diferentes estruturas clivadas 72 horas após a fecundação.....	49
Tabela 10- O desenvolvimento de embriões submetidos ao tratamento com a metformina nos primeiros três e últimos quatro dias do cultivo.....	49
Tabela 11- A produção de embriões de meios acrescentados de metformina.....	51
Tabela 12- Efeito da metformina na distribuição e oxidação dos lipídios embrionários.....	52
Tabela 13- O desenvolvimento embrionário a partir de oócitos maturado e zigotos cultivados com metformina.....	55
Tabela 14- Os blastômeros totais e apoptóticos em blastocistos produzidos de meios suplementados com metformina.....	55
Tabela 15- Efeito da presença da metformina durante a maturação e o cultivo na recuperação e na eclosão pós-vitrificação de blastocistos.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilato Ciclase
ACC	Acetil-CoA Carboxilase
Acetil-CoA	Acetil-Coenzima A ( <i>Acetyl Coenzyme A</i> )
AGs	Ácidos Graxos
AGs-MI	Ácidos Graxos monoinsaturados
AH	Hialuronano (Ácido Hialurônico)
AHS	AH Sintase
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
AMPK	<i>Adenosine Mono-Phosphate-Activated Protein Kinase</i> (quinase ativada por monofosfato de adenosina)
ASB	Albumina de Soro Bovino
ATP	<i>Adenosine Tri-Phosphate</i> (Trifosfato de adenosina)
BL	Blastocisto
BTZO-1	Benzotiazina
BUTLI	Butirolactona I
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCOs	Complexo <i>Cumulus</i> -Oócitos
CD36	<i>Cluster of Differentiation 36</i>
cdks	kinases dependentes de ciclinas
CEUA/UFV	Comissão de Ética no Uso de Animais/Universidade Federal de Viçosa
CIV	Cultivo <i>In Vitro</i>
CMT	Cultivo com Metformina

CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CRIO 1	Criopreservação 1
CRIO 2	Criopreservação 2
CRMT	Cultivo e Renovação de 50% do meio de cultivo com a Metformina
CTE	Cadeia de Transporte de Elétrons
DAG	Diglicerídeo
DAPI	<i>4'6-Diamidino-2-Phenylindole</i>
DGAT	<i>Di-Glyceride Acyl-Transferase</i> (Diglicerídeo aciltransferase)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxirribonucleico)
E-BODIPY	Estoque de BODIPY <sup>581/591</sup> C <sub>11</sub>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (Fator de crescimento epidérmico)
EGFRs	<i>Epidermal growth factor receptors</i> (Receptores de fator de crescimento epidérmico)
ELOVL	<i>Elongation of Very Long Chain Fatty Acids Protein</i> (Enlongase de ácidos graxos de longa cadeia)
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EMT	Estoque de Metformina
EPM	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EXP	Experimento
FABPs	<i>Fatty Acid Binding Proteins</i> (Proteínas ligantes de ácido graxo)
FADSs	<i>Fatty Acid Desaturases</i> (Dessaturase de ácido graxo)
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FATPs	<i>Fatty Acid Transport Proteins</i> (Proteínas transportadoras de ácido graxos)

FFAR4	<i>Free Fatty Acids Receptor 4</i> (Receptor 4 de ácido graxo)
FIV	Fecundação <i>In Vitro</i>
FPM	Fator Promotor da maturação
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i> (Hormônio folículo-estimulante)
G	Glicose
G6P	<i>Glucose-6-Phosphate</i> (Glicose-6-fosfato)
G6PDX	<i>Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase X-linked</i> (Glicose-6-fosfato desidrogenase ligado ao cromossomo X)
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i> (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)
GLUT	<i>Glucose Transporters</i> (Transportador de glicose)
GPAT	<i>Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase</i> (Glicerol-3-fosfato O-aciltransferase)
GSH	Glutathiona
GVBD	<i>Germinal Vesicle Break-Down</i> (Rompimento da vesícula germinativa)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>Hydrogen Peroxide</i> (Peróxido de hidrogênio)
HK	Hexoquinase
HO	Hidroxila
LDH	<i>Lactate Dehydrogenase</i> (Lactato desidrogenase)
LH	<i>Luteinizing Hormone</i> (Hormônio luteinizante)
LPA	<i>Lysophosphatidic Acid</i> (Ácido lisofosfatídico)
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>In Vitro</i>
mM	Milimolar
MMT	Maturação com Metformina

MT	Metformina
NRF2	<i>Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2</i> (Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2)
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
P	<i>Phosphorylation</i> (Fosforilação)
PA	<i>Phosphatidic Acids</i> (Fosfatídeo)
PAP	<i>Phosphatidic Acid Phosphatase</i> (Fosfatase do PA)
PDH	<i>Pyruvate Dehydrogenase</i> (Piruvato desidrogenase)
PED	Fosfodiesterase
PEP	<i>Phosphoenolpyruvate</i> (Fosfoenolpiruvato)
PES	<i>Phenazine Ethosulfate</i> (Etossulfato de fenazina)
PIVE	Produção <i>In Vitro</i> de Embriões
PLIN	Perilipina
PMT	Pré-Maturação com Metformina
PNC	Peptídeo Natriurético tipo C
PPP	<i>Pentose Phosphate Pathway</i> (Via de pentose fosfato)
Pré-MIV	Pré-maturação <i>In Vitro</i>
Proteína p21	Proteína um interagida com o inibidor da cinase dependente de ciclina
PUFAs	<i>Polyunsaturated Fatty Acids</i> (Ácidos graxos poli-insaturados)
RCF	<i>Relative Centrifugal Force</i> (Força centrífuga relativa)
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico)
RNA-m	RNA- mensageiros
rTdT	<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, Recombinant</i> (Desoxinucleotidil-terminal transferase, recombinante)

SFB	Soro Fetal Bovino
SOD	Superóxido Dismutase
SOF	<i>Synthetic Oviductal Fluid</i> (Fluido sintético do oviduto)
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i> (Salino citrato de sódio)
TAG	Triacilglicerol
TALP	<i>Tyrode's medium base, Albumin, Lactate and Pyruvate</i> (Meio de Tyrode de albumina, lactato e piruvato)
T-BODIPY	Trabalho de BODIPY <sup>581/591</sup> C <sub>11</sub>
TCM-199	<i>Tissue Culture Medium 199</i> (Meio de cultivo de tecido 199)
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP- digoxigenin Nick End-Labeling</i>
μM	Micomolar
ZP	Zigoto Presumível

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1. Crescimento e maturação oocitários e desenvolvimento pós-fecundação.....	22
2.2. Metabolismo em oócitos e embriões.....	23
2.3. Aspectos moleculares do metabolismo e processos relacionados.....	24
2.4. Bloqueio in vitro da meiose.....	27
2.5. Criopreservação de embriões bovinos.....	27
2.6. Antioxidantes exógenos utilizados.....	28
2.7. Modulação de metabolismo embrionário.....	29
2.8. Metformina.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1. Aspectos éticos.....	31
3.2. Local e reagentes.....	31
3.3. Desenho experimental.....	32
3.4. Preparação das soluções.....	33
3.4.1. Cloridrato de 1,1-dimetilbiguanida (Metformina).....	33
3.4.2. Meios da Pré-maturação in vitro.....	33
3.4.3. Sonda de lipídios totais e oxidados.....	35
3.4.4. Meios de vitrificação e aquecimento.....	35
3.5. Produção in vitro de embriões.....	35
3.6. Avaliação da qualidade de blastocistos.....	36
3.7. Distribuição e oxidação de lipídios.....	37
3.8. Vitrificação.....	38
3.9. Análise estatística.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1. EXP1 (Metformina-Pré-Maturação) .....	40
4.1.1. EXP1.1.....	40
4.1.2. EXP1.2.....	41
4.2. EXP2 (Metformina-Maturação) .....	42
4.3. EXP3 (Metformina-Cultivo) .....	46
4.3.1 EXP3.1 (Renovação de meio).....	46
4.3.2. EXP3.2 (Sem renovação de meio).....	46

4.3.3. EXP3.3. (Duas partes de cultivo).....	48
4.4. EXP4 (Metformina-Maturação e Cultivo).....	51
4.5. EXP5 (Metformina-Criopreservação).....	55
5. CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICE A - Supplementation of in vitro maturation medium with metformin improves the development of bovine in vitro-fertilized oocytes toward expanded blastocyst stage.....	88
APÊNDICE B - Metformin ameliorates bovine zygotes development.....	90
ANEXO A – Certificado nº 51/202.....	91

## 1. INTRODUÇÃO

A competência oocitária é a habilidade de um oócito para maturar, ser fecundado e desenvolver-se em embriões saudáveis (Eppig et al., 2002; Conti e Franciosi, 2018), o que reflete na criotolerância, pois a qualidade embrionária é essencial para o sucesso da criopreservação (Valente et al., 2022).

A capacidade de desenvolvimento dos oócitos, a qualidade embrionária (Luvoni et al., 1996; Hashimoto et al., 2002; Rizos et al., 2002) e a criotolerância dos embriões produzidos *in vitro* são inferiores em comparação com seus equivalentes *in vivo* (Matos et al., 1996; Khurana e Niemann, 2000; Sudano et al., 2011) devido ao ambiente subótimo de cultivo *in vitro*. Isso leva à reações degradantes nas células (Birben et al., 2012; Soto-Heras e Paramio, 2020; Keane e Ealy, 2024) e nos seus lipídios (Pap et al., 1999; Drummen et al., 2002; Su et al., 2019), causadas pelo aumento da formação desequilibrada das espécies reativas de oxigênio (EROs) induzido pela tensão elevada de O<sub>2</sub> do ambiente *in vitro*, geralmente 20% quando comparado com 5%-6% do ambiente *in vivo* (Luvoni et al., 1996; Paula et al., 2008; Gad et al., 2012). Esses radicais livres são subprodutos de cadeia de transporte de elétrons (CTE) com seus complexos de proteínas transmembranas, especialmente dos complexos I e III (Boonstra e Post, 2004; Kowaltowski et al., 2009). Além disso, o número alto das organelas lipídicas em embriões produzidos *in vitro* é uma consequência da absorção de ácidos graxos (Torre-Sanchez et al., 2006a) e do favorecimento da oxidação de glicose em detrimento da lipólise (Khurana e Niemann, 2000; Torre-Sanchez et al., 2006a), que compromete o desenvolvimento embrionário (Kurzella et al., 2023) e a recuperação após o congelamento (Leibo e Loskutoff, 1993).

Os antioxidantes adicionados, por exemplo, as enzimas o superóxido dismutase (SOD) (Luvoni et al., 1996; Ali et al., 2003) e a catalase (Rocha-Frigoni et al., 2016) estimulam reações químicas indesejadas (Luvoni et al., 1996; Ali et al., 2003; Rocha-Frigoni et al., 2016) enquanto outros neutralizantes, tal como a vitamina E (Dalvit et al., 2005), o resveratrol (Takeo et al., 2014; Gaviria et al., 2019), a cantaxantina (Shebli, 2018) e o petrostilbene (Sosa et al., 2020) reduzem a função celular de moléculas intrínsecas (Nikawa et al., 1995; Dalvit et al., 2005; Chankitisakul et al., 2013; Sosa et al., 2020).

Além disso, a manipulação de vias metabólicas pelo dinitrofenol (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007a) e pela carnitina causa redução na produção *in vitro* de

embriões (Dias et al., 2020), enquanto a qualidade de blastocistos foi diminuída pelo etossulfato de fenazina (PES) (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007a) e a forskolina (Paschoal et al., 2017). No caso de ácido linoleico, há contradição no desenvolvimento embrionário resultante entre os estudos (Darwich et al., 2010; Batista et al., 2014; Lima et al., 2017; Dias et al., 2020).

Ainda esses mecanismos não se mostraram eficientes para atender à demanda de uma crioresistência melhorada (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007b; Sanches et al., 2013; Paschoal et al., 2014; 2017; Gaviria et al., 2019; Oliveira et al., 2022).

A metformina (MT), uma biguanidina com ação antihiperlipidêmica usada para tratamento de diabetes tipo 2, atua na inibição do complexo I da CTE (El-Mir et al., 2000), reduzindo a captação de ácidos graxos (Song et al., 2010) e a estruturação das gotas lipídicas citoplasmáticas (Zang et al., 2004). Em pesquisas anteriores, a MT foi estudada como um ativador de quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) em oócitos (Bilodeau-Goeseels et al., 2007; Tosca et al., 2007; Pikiou et al., 2015) e embriões bovinos (Hong et al., 2009; Pikiou et al., 2015), mas, as suas funções como uma protetora contra os danos oxidativos e uma moduladora de acúmulo de lipídios celulares e a inferência dessas ações na resistência das condições da criopreservação não foram identificadas.

A hipótese deste estudo é que o mecanismo de ação da MT contribua para que oócitos e embriões enfrentem os desafios de um ambiente *in vitro* subótimo, o que geralmente culmina com embriões de menor qualidade. Assim, espera-se uma melhora no potencial de desenvolvimento de oócitos e embriões com reflexo na criotolerância dos blastocistos produzidos.

O objetivo desse estudo, portanto, foi avaliar os efeitos da suplementação de metformina nos meios de maturação e produção *in vitro* e subsequente criotolerância de embriões bovinos. Dessa forma, este trabalho avaliou a produção e viabilidade de embriões, além da quantidade de lipídios neutros integrais e oxidados, e da evolução pós-vitrificação nos blastocistos obtidos a partir de meios acrescentados da MT.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Crescimento e maturação oocitários e desenvolvimento pós-fecundação

No decurso da onda folicular, os oócitos continuam crescendo (Fair et al., 1997; 2002; Otoi et al., 1997; Armstrong et al., 2002) e progredindo em sua capacidade de desenvolvimento (Blondin et al., 1997; Lequarre et al., 2005), com modificações celulares (Lodde et al., 2007) e moleculares (Luciano et al., 2011; Tian et al., 2022). Essas modificações envolvem redistribuição das organelas (Fair et al., 2002) e o acúmulo de proteínas e ácido ribonucleico mensageiros (RNA-m) (Bilodeau-Goeseels, 2012; Xu et al., 2019; Pasquariello et al., 2020; Tian et al., 2022). Enquanto isso, o núcleo oocitário que está encolhendo (Fair et al., 2002), permanece suspenso na prófase I da meiose por ação de sinais hormonal-celulares (Kotsuji et al., 1994; Blondin et al., 1997; Thomas et al., 2002; Bilodeau-Goeseels et al., 2007; Zhang et al., 2017; Xi et al., 2018), e no mesmo intervalo a atividade do fator promotor da maturação (FPM) fica baixa (Kubelka et al., 2000).

Em um folículo dominante, as camadas de células do *cumulus* cercam o gameta feminino, estendendo suas ligações através dos poros da zona pelúcida (Suzuki et al., 1994) para o ooplasma, que contém as gotas lipídicas aglomeradas (aparência opaca) (Nagano et al., 2006) e as mitocôndrias, os grânulos corticais, o aparelho de Golgi e o retículo endoplasmático (Fair et al., 1997), além da vesícula germinativa (VG) periférica (Lodde et al., 2007). Esse oócito é preparado para responder ao pico ovulatório provocado pelo hormônio luteinizante (LH), que interrompe os sinais inibidores da meiose e leva à expansão das células do *cumulus* (Thomas et al., 2004; Yang et al., 2016; Xi et al., 2018) e induz o rompimento da VG (GVBD) acompanhado pela ativação do FPM (Fissore et al., 1996; Wu et al., 1997). Inicia-se então a segunda divisão meiótica que continua para a metáfase II (MII) (Sirard et al., 1989), mantendo-se nessa fase pelo aumento do FPM ativo (Wu et al., 1997) até a ativação do oócito. Esse processo é acompanhado com mudanças na morfologia e arranjo dos elementos citoplasmáticos (Stojkovic et al., 2001; Ferreira et al., 2009).

Um oócito maturado possui uma reserva de aminoácidos (Matos et al., 1997; Gandolfi et al., 1998; Lim et al., 1999; Cetica et al., 2003; Uhde et al., 2018), e de precursores energéticos (Geshi et al., 2000; Kim et al., 2001; Ferguson e Leese, 2006) que os tornam aptos à fecundação normal, e a formação dos pronúcleos, os quais após da fusão resultam na primeira célula embrionária (Grisart et al., 1994).

O zigoto inicia as multiplicações mitóticas sucessivas, as quais perdem a sua simetria em direção ao estágio de 8-16 blastômeros (Grisart et al., 1994), quando, ocorre a transição materno-embrionária (Grisart et al., 1994; Meirelles et al., 2004) na espécie bovina. Nesse estágio ocorre o surgimento de blastômeros apoptóticos (Byrne et al., 1999; Matwee et al., 2000; Gjorret et al., 2003) e da diferenciação celular (Oliveira et al., 2024), e somente os embriões desenvolvidos a partir de oócitos competentes podem progredir consecutivamente (Grisart et al., 1994; Meirelles et al., 2004).

Com a compactação da mórula e a cavitação embrionária, as comunicações entre as células do trofoblasto (desmossomos) e da massa celular interna (junções-gap) tornam-se mais evidentes (Boni et al., 1999; Gopichandran e Leese, 2003) e a ocorrência da morte celular programada aumenta até o estágio de blastocisto expandido (Byrne et al., 1999; Leidenfrost et al., 2011).

## **2.2. Metabolismo em oócitos e embriões**

Nos folículos antrais, as células do *cumulus* garantem um teor lipídico oocitário constante (Aardema et al., 2017; Annes et al., 2019), e em resposta ao sinal da ovulação, elas fornecem nutrientes ao oócito (Cetica et al., 2003) e secretam ácido hialurônico (AH) (Marei et al., 2012), além de exercer o seu papel lipogênico (Sanchez-Lazo et al., 2014; Faria et al., 2021). Contrariamente, nos oócitos, a utilização de piruvato (Sutton et al., 2003) e o número das gotas lipídicas aumentam (Oliveira et al., 2022).

Nos embriões, mudanças marcantes ocorrem na transição materno-embrionária, quando a absorção de ácidos graxos (Ferguson e Leese, 2006) e a glicólise começam a progredir (Khurana e Niemann, 2000). No estágio de mórula compacta, ocorre a síntese e a condensação máxima de lipídios (Sudano et al., 2016), juntamente com o aumento na atuação da bomba de sódio-potássio (Mcgeady et al., 2006). Posteriormente, no estágio do blastocisto, o consumo do piruvato incrementa (Khurana e Niemann, 2000) e a abundância dos lipídios citoplasmáticos diminui (Sudano et al., 2016).

### 2.3. Aspectos moleculares do metabolismo e processos relacionados

O trifosfato de adenosina (ATP) é catalisado por adenilato ciclase (AC) (Kamenetsky et al., 2006; Marín-Aguilar et al., 2017) para gerar o adenosina monofosfato cíclico (AMPC), e em seguida a fosfodiesterase (PDE) converte o AMPC para 5'AMP que ativa a AMPK (Kamenetsky et al., 2006; Bilodeau-Goeseels et al., 2007; Tosca et al., 2007; Marín-Aguilar et al., 2017), e essa ativação preserva o consumo da energia metabólica (Marín-Aguilar et al., 2017).

O hormônio folículo-estimulante (FSH) ativa AC e inibi PDE nas células somáticas entra-foliculares (Thomas et al., 2002) e induz a produção de peptídeo natriurético tipo C (PNC) nas células da granulosa mural, este PNC liga-se com seus receptores no *cumulus* (Thomas et al., 2002; Xi et al., 2018) e no oolema (Thomas et al., 2002; Zhang et al., 2016) para inibir PDE oocitária (Bilodeau-Goeseels et al., 2007; Tosca et al., 2007), e essa rede de sinalização leva ao nível tônico alto do AMPC nos componentes do folículo antral que suspende a maturação oocitária (Aktas et al., 1995; Thomas et al., 2002).

O LH induz a  $\beta$ -oxidação de lipídios nas mitocôndrias (Sanchez-Lazo et al., 2014) e diminui a produção de PNC (Yang et al., 2016), além da expressão dos seus receptores oocitários (Xi et al., 2018). Por sua vez a  $\beta$ -oxidação causa um aumento transitório nas concentrações de AMPC nas células da granulosa murais, e este aumento induz a expressão de peptídeos semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF) (Park et al., 2004) que ativam os receptores do EGF (EGFRs) nas células de *cumulus* que levam a preparação e o começo da maturação nuclear bem como a expansão das células de *cumulus* (Conti et al., 2006; Dunning et al., 2014; Sanchez-Lazo et al., 2014).

Antes do sinal da ovulação, a geração de ATP permanece constante (Aguilar et al., 2020), enquanto atividade da AMPK encontra-se alta, o que é essencial para manter o núcleo na fase da VG (Tosca et al., 2007). À medida que o núcleo prossegue para a MII, ocorre aumento na produção de ATP (Sutton et al., 2003) e a atividade de AMPK reduz (Tosca et al., 2007). Após a fecundação, o nível da ATP continua elevado, diminui durante a compactação da mórula, para subir novamente nos estágios seguintes (Thompson et al., 1996). No entanto, até onde sabemos, não temos informações sobre as alterações na quinase após o desenvolvimento embrionário inicial, apenas a sua atividade maior em blastocistos produzidos *in vivo* em

comparação com *in vitro* (Prastowo et al., 2016).

O processo metabólico é acompanhado pela liberação das EROs, principalmente superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hidroxila (HO) (Luvoni et al., 1996). Esses derivados de dióxido possuem efeitos fisiológicos e influenciam o progresso do ciclo e as sinalizações celulares (Turrens, 2003; Kowaltowski et al., 2009; Hardy et al., 2021), mas quando sua quantidade excede a capacidade do sistema antioxidante, promovem a oxidação de ácido graxos, especialmente os poli-insaturados (Pap et al., 1999; Drummen et al., 2002; Su et al., 2019) e causam danos às células (Birben et al., 2012).

Esse desequilíbrio acontece nas condições artificiais da produção *in vitro* de embriões (Luvoni et al., 1996; Paula et al., 2008; Gad et al., 2012), e leva à danificação na habilidade oocitária de desenvolvimento pós-fecundação (Luvoni et al., 1996; Rizos et al., 2002; Soto-Heras e Paramio, 2020) e na viabilidade dos blastocistos produzidos (Soto-Heras e Paramio, 2020; Keane e Ealy, 2024) que por sua vez reduz a resistência embrionária aos crio-protetores e às temperaturas baixas da preservação (Matos et al., 1996; Sudano et al., 2011; Valente et al., 2022; Keane e Ealy, 2024).

A formação desses radicais livres reduz com o crescimento do diâmetro do antro (Gupta et al., 2011), aumenta no início e no final da maturação (Morado et al., 2009), e continua elevando após a penetração de espermatozoide (Morado et al., 2013), atingindo o seu máximo no estágio da mórula compacta, para diminuir posteriormente (Dalvit et al., 2005).

O gameta feminino progride para um oócito maturado, e posteriormente, para blastocisto, usando a glicose como a fonte essencial de energia (Khurana e Niemann, 2000; Ferguson e Leese, 2006; Sutton-McDowall et al., 2012). Esse sacarídeo atravessa a membrana celular por meio de transportadores GLUT (1, 3, 4 e 8) (Augustin et al., 2001; Mota et al., 2015; Lipinska et al., 2021). Além dos carboidratos, os ácidos graxos são também absorvidos, o que ocorre por meio da proteína ligante 3 (FABP3), da proteína de transporte 1 (FATP1) (Sanchez-Lazo et al., 2014; Faria et al., 2021), do CD36 (Kajdasz et al., 2020) e do receptor 4 (FFAR4) (Idrissi et al., 2022). Essa absorção é seguida pelas ações de enzimas lipogênicas, em princípio, a acetil-CoA carboxilase (ACC), enlongases 5 de ácidos graxos de longa cadeia (ELOVL5) (Sanchez-Lazo et al., 2014; Faria et al., 2021) e a FABP4 (Idrissi et al., 2022).

Os ácidos graxos mono- e poli-insaturados correspondem à uma pequena parte ( $\approx 16\%$ ) do perfil lipídico embrionário (Rooke et al., 2012), mas são importantes na

lipogênese (Figura 1), a qual termina com a formação do triacilglicerol (TAG) (Koundouros e Pouligiannis, 2020). Esse produto final é cercado por uma membrana derivada do retículo endoplasmático (RE) para constituir as gotas lipídicas (Kersten, 2001; Olzmann e Carvalho, 2019; Jeon et al., 2023), e tais organelas possuem ação protetora contra a distribuição livre dos lipídios no citoplasma (Bensaad et al., 2014; Aardema et al., 2017).

Em embriões produzidos *in vitro*, a obtenção de lipídios a partir dos meios de cultivo (Ferguson e Leese, 2006; Sudano et al., 2016) e a sua baixa participação na energia metabólica (Torre-Sanchez et al., 2006a) devido à glicólise elevada (Khurana e Niemann, 2000), levam a um armazenamento lipídico maior em comparação com aqueles originados no útero (Torre-Sanchez et al., 2006a).

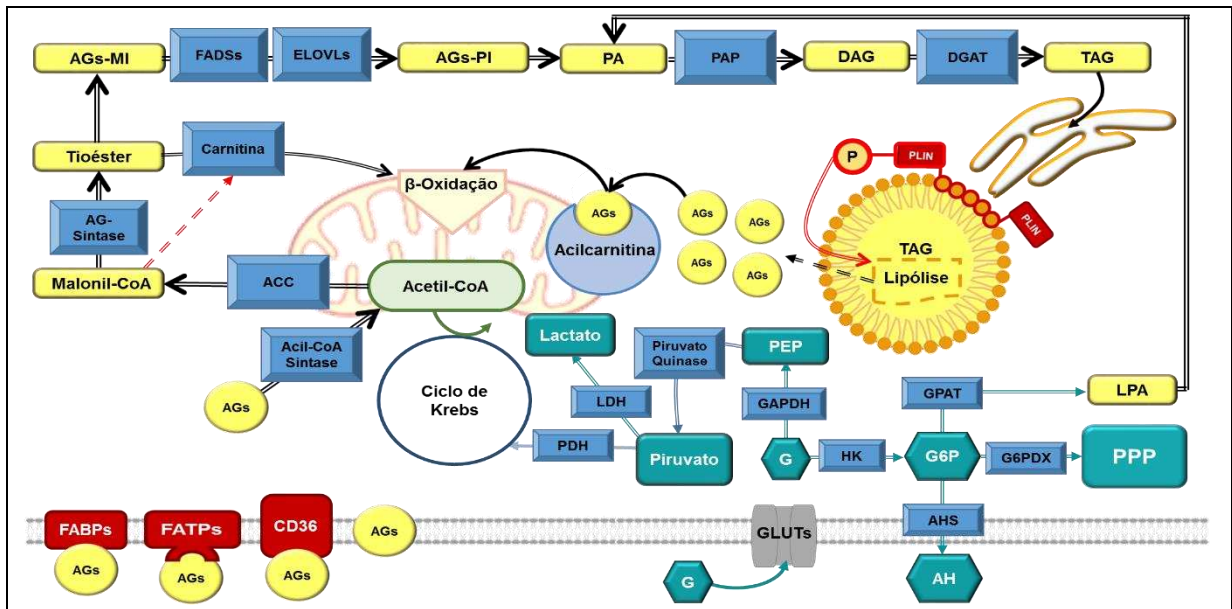


Figura 1- Lipogênese e formação das gotas lipídicas. Ilustração de absorção dos lipídios e glicose, a formação das organelas lipídicas, lipólise, glicólise e a participação dos sacarídeos na lipogênese. ■ : enzima, 🏠 : retículo endoplasmático, seta com duas linhas indica a transformação. **AGs**: ácidos graxos, **FABPs**: proteínas ligantes de ácido graxo, **FATPs**: proteínas de transporte de ácidos graxos, **CD36**: receptor scavenger, **ACC**: acetil-CoA carboxilase, **AGs-MI**: ácidos graxos monoinsaturados, **ELOVLs**: alongases de ácidos graxos de longa cadeia, **FADSS**: dessaturase de ácido graxo 2, **PUFAs**: ácidos graxos poliinsaturados, **PA**: fosfatídeo, **PAP**: fosfatase do PA, **DAG**: diglicerídeo, **DGAT**: diglicerídeo aciltransferase, **TAG**: triacilglicerol, **PLIN**: perilipina, **P**: fosforilação, **G**: glicose, **GLUTs**: transportadores de glicose, **GAPDH**: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, **PEP**: fosfoenolpiruvato, **LDH**: lactato desidrogenase, **PDH**: piruvato desidrogenase, **HK**: hexoquinase, **G6P**: glicose-6-fosfato, **AH**: ácido hialurônico, **AHS**: HA sintases, **G6PDX**: glicose-6-fosfato desidrogenase ligado ao cromossomo X, **PPP**: via das pentoses-fosfato, **GPAT**: glicerol-3-fosfato O-aciltransferase, **LPA**: ácido lisofosfatídico. O desenho da figura é baseado nos estudos de Hundal et al. (1992), Fischer et al. (1995), Tian et al. (1998), Kersten (2001), Zang et al. (2004), Song et al. (2010), Guo et al. (2012), Bensaad et al. (2014), Kane (2014), Oseikria et al. (2016), Lund et al. (2018), Olzmann e Carvalho (2019), Lipinska et al. (2021), Edwards e Mohiuddin (2022), Jeon et al. (2023) e Talley e Mohiuddin (2023).

## 2.4. Bloqueio *in vitro* da meiose

A inibição reversa do início da meiose pode melhorar a produção de embriões (Lonergan et al., 2003), pois essa retomada espontânea que ocorre depois da punção dos folículos antrais diminui a capacidade de desenvolvimento pós-fecundação (Yang et al., 1998; Rizos et al., 2002), também, essa inibição reduz a variação no tempo de GVBD entre oócitos obtidos sucessivamente das doadoras (Guemra et al., 2014), permitindo uma maturação harmonizada para a obtenção de resultados melhores na PEIV (Koyama et al., 2014).

Entre os métodos abordados é salvar o FPM [formado de ciclina dependente de kinase e ciclina B (Wu et al., 1997)] inativo por tempo prolongado (12-24 horas), utilizando uma inibidora de ciclinas dependente de kinase (cdks), tal como a butirolactona I (BUTLI) (Kubelka et al., 2000; Lonergan et al., 2000; Hashimoto et al., 2002; Adona et al., 2008; Maziero et al., 2020). Porém, a pré-maturação não atinge ao melhoramento esperado nos resultados da PIVE (Adona et al., 2008; Guemra et al., 2014) provavelmente devido ao ambiente subótimo *in vitro* (Hashimoto et al., 2002; Paula et al., 2008).

## 2.5. Criopreservação de embriões bovinos

A técnica de manter os blastocistos quiescentes na temperatura baixa apresenta importância no manejo da reprodução, especialmente a vitrificação devido à eficiência (Nedambale et al., 2004; Gómez et al., 2020), à acessibilidade e ao baixo custo quando comparada como o congelamento convencional (Valente et al., 2020).

A viabilidade dos embriões produzidos *in vitro* é considerada um dos limites básicos da sua capacidade de continuar o desenvolvimento após a remoção do ambiente da criopreservação (Sudano et al., 2011), e essa capacidade é chamada de criotolerância (Valente et al., 2020). No entanto, a teoria conhecida da relação quantidade lipídica-crioresistência (Leibo e Loskutoff, 1993), não é bem confirmada (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007b; Sudano et al., 2011; Sanches et al., 2013; Paschoal et al., 2017), aliás, Banliat et al. (2019) encontraram que a recuperação pós-vitrificação depende de tipos específicos de ácidos graxos. Também, a peroxidação lipídica como um estímulo da degeneração celular (Su et al., 2019) provavelmente poder ser

relacionada com a criotolerância diminuída.

As estratégias de proteger os embriões contra os danos oxidativos e redirecionar o consumo e armazenamento de substâncias energéticas o desenvolvimento embrionário, com a finalidade de otimizar o desenvolvimento após o aquecimento são detalhadas em 2.6 e 2.7.

## **2.6. Antioxidantes exógenos utilizados**

Os antioxidantes eliminam as EROs ou impedem a sua formação preservando o equilíbrio oxidante/antioxidante e prevenindo o dano oxidativo (Azzi et al., 2004; Birben et al., 2012; Su et al., 2019). Essas substâncias são classificadas de acordo com seus mecanismos em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Liu, 2004; Su et al., 2019), e conforme sua origem em naturais e sintéticos (Augustyniak et al., 2010).

Os oócitos bovinos têm seu próprio sistema antioxidante, incluindo o SOD, a glutathione peroxidase, a catalase (Cetica et al., 2001), e a glutathione (GSH) (Galano e Alvarez-Idaboy, 2011). Essa defesa nos embriões é formada pelas mesmas enzimas (Harvey et al., 2004), além da GSH (Takahashi et al., 1993; Sun et al., 2015) e do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (NRF2) (Amin et al., 2014).

O incremento no desenvolvimento pós-fecundação de oócitos maturados não foi atendido com a GSH (Curnow et al., 2010), o resveratrol (Takeo et al., 2014) e a nicotinamida (El-Sheikh et al., 2020), mas foi com a quercetina (Sovernigo et al., 2017; Davoodian et al., 2022), licopeno (Chowdhury et al., 2017), o piceid (Khan et al., 2017), a melatonina (Zhao et al., 2018), a epigallocatequina galato (Huang et al., 2018), a benzotiazina (BTZO-1) (Aboelenain et al., 2020), a carnosina (Idrissi et al., 2022), a gamma-oryzanol, (Davoodian et al., 2024) e a limonina (Jiao et al., 2024).

Algumas dessas substâncias supramencionadas tiveram efeitos benéficos na qualidade embrionária, mas mesmo assim, isso foi no tempo prolongado de cultivo (>168 horas após a fecundação) (Curnow et al., 2010; Takeo et al., 2014; Chowdhury et al., 2017; Sovernigo et al., 2017; Aboelenain et al., 2020), o qual pode não ser uma observação de interesse, especialmente para os fins das transferência e criopreservação de blastocistos (Niemann et al., 1982; Hasler et al., 1995; Gómez et al., 2020).

Achados insatisfatórios na competência oocitária foram atribuídos à provocação da geração do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na matriz extracelular (Luvoni et al., 1996; Ali et al., 2003; Rocha-Frigoni et al., 2016), usando o SOD (Luvoni et al., 1996; Ali et al., 2003) e a catalase (Rocha-Frigoni et al., 2016), e à incorporação do alfa-tocoferol (Dalvit et al., 2005), da cantaxnatina (Shebli et al., 2018) e da carnitina (Chankitisakul et al., 2013) com os lipídios e a restrição da sua atuação vital (Nikawa et al., 1995; Dalvit et al., 2005; Chankitisakul et al., 2013).

Os embriões cultivados com a cisteína (Takahashi et al., 1993; Ali et al., 2003), a GSH (Sun et al., 2015), a melatonina (Marques et al., 2021) e o ácido lipoico (Fabra et al., 2023) avançaram em seu desenvolvimento, por outro lado, achados não atingiram aos esperados obtidos com o uso dos precursores da GSH (Rocha-Frigoni et al., 2015), e o petrostilbene (Sosa et al., 2020), provavelmente devido à alta eliminação dos radicais livres e da sua participação ao nível celular (Dalvit et al., 2005; Sosa et al., 2020).

Independentemente da produção de embriões resultantes da adição de antioxidantes, a criotolerância de blastocistos não foi afetada (Gaviria et al., 2019), ou foi melhorada (Marques et al., 2021) ou diminuída (Fabra et al., 2023).

Vale destacar as inconsistências entre os estudos, por exemplo, o ascorbato não apresentou mudança na produção de embriões (Dalvit et al., 2005), no entanto Sovernigo et al. (2017) afirmaram um avanço, e o mesmo para o uso da cisteína entre Rocha-Frigoni et al. (2016) e Ali et al. (2003) e do 2- mercaptoetanol entre Darwich et al. (2010) e Hosseini et al. (2009).

## **2.7. Modulação de metabolismo embrionário**

Modular o processo metabólico é uma tentativa de reduzir o depósito lipídico embrionário (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007b; Darwich et al., 2010; Sudano et al., 2011; Sanches et al., 2013), o que por sua vez pode fortalecer a crioresistência dessas estruturas (Leibo e Loskutoff, 1993).

Esta tentativa não atingiu a meta após a inibição da lipogênese pelo ácido linoleico (Dias et al., 2020) e pela cerulenina (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007a), ou após a manipulação de glicólise pelos dinitrofenol e a azida de sódio (Torre-Sanchez et al., 2006a). Por outro lado, a diminuição do acúmulo de lipídios foi alcançado pela

indução da  $\beta$ -oxidação dos ácido graxos com a carnitina (Dias et al., 2020) e da lipólise com a forskolina (Sanches et al., 2013; Paschoal et al., 2014; 2017), e pela intensificação da via de pentose fosfato (PPP) com PES (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007a; Torre-Sanchez et al., 2006a; Sudano et al., 2011) contudo uma redução na produção de blastocistos, na viabilidade embrionária e no número de blastômeros foi detectada em embriões cultivados com carnitina (Dias et al., 2020), forskolina (Paschoal et al., 2017) e PES (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007a) respectivamente.

De maneira geral, a recuperação e o desenvolvimento pós-criopreservação dos embriões não alcançou o benefício desejado (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007b; Darwich et al., 2010; Sudano et al., 2011; Sanches et al., 2013; Paschoal et al., 2014; Oliveira et al., 2022) nem com a redução do acúmulo de lipídios (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007a; Paschoal et al., 2017; Dias et al., 2020).

## 2.8. Metformina

A metformina (MT) ( $C_4H_{11}N_5$ ) possui propriedade hidrofílica (Al-Zaidan et al., 2017; Lange et al., 2021) e modera a liberação de EROs através da inibição direta, seletiva e frágil do complexo I da CTE nas células hepáticas normais (El-Mir et al., 2000) e malignas de roedores (Owen et al., 2000), e nos carcinomas intestinal e prostático em humanos (Wheaton et al., 2014). Essa ação pode mitigar o impacto do excesso da formação dos radicais livres no sistema *in vitro* durante a suspensão da meiose (Hashimoto et al., 2002), a maturação (Luvoni et al., 1996; Paula et al., 2008; Gad et al., 2012) e o cultivo (Gad et al., 2012), e consequentemente otimizar a crioresistência de blastocistos (Matos et al., 1996; Valente et al., 2022), além de evitar a modificação dos papéis fisiológicos dos agentes oxidantes (Dalvit et al., 2005; Sosa et al., 2020) e dos ácidos graxos, o que distingue a MT de outros antioxidantes estudados anteriormente (Nikawa et al., 1995; Dalvit et al., 2005; Chankitisakul et al., 2013; Sosa et al., 2020).

A MT suprime a acetil-CoA carboxilase nos hepatócitos obtidos de tumor maligno (Zang et al., 2004) além da FABP4 nos leucócitos humanos, causando diminuição na quantidade de lipídios (Song et al., 2010). Isso é capaz de reduzir o acúmulo de lipídio nos blastômeros e potencializar o desenvolvimento nos períodos da pré-implantação (Kurzella et al., 2023) e da pós-reaquecimento depois a criopreservação (Leibo e

Loskutoff, 1993), sem decomposição direta dos lipídios, a qual leva a efeitos prejudiciais na qualidade (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007a; Paschoal et al., 2017) e na produção de blastocistos (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007a; Dias et al., 2020).

Ainda, a MT aumenta a capacidade do GLUT1 no tecido muscular de ratos (Hundal et al., 1992; Fischer et al., 1995), e esse transportador é mais ativo em embriões bovinos viáveis em comparação com os produzidos em condições subótimas (Knijn et al., 2002; Harvey et al., 2004), de maneira que a MT pode aprimorar o metabolismo de glicose no embriões produzidos *in vitro*.

O presente trabalho beneficia-se dos estudos da células malignas supracitados, devido à sua semelhança nos metabolismos glicolítico e lipogênico com os embriões bovinos (Paczkowski et al., 2012; Smith e Sturmey, 2013).

A MT atua de maneira dose-dependente nos gametas femininos, por exemplo, <5 mM inibem o progresso da meiose em oócitos bovinos (Bilodeau-Goeseels et al., 2007; Tosca et al., 2007) enquanto  $10^{-3}$  mM não afeta a maturação nuclear (Tosca et al., 2007; Hong et al., 2009) ou a produção de embriões (Hong et al., 2009).

As doses utilizadas no presente trabalho foi calculadas dependendo nos estudos de Alexandre et al. (2008).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Aspectos éticos**

O projeto foi certificado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, CEUA/UFV (Processo nº 51/2021, de acordo com a Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008) (ANEXO A).

#### **3.2. Local e reagentes**

Os experimentos foram realizados no laboratório da reprodução animal na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)-Embrapa Gado de Leite e na Gênese Reprodução Animal, ambos em Juiz de Fora, MG. Os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma- Aldrich, Brasil, salvo indicação em contrário.

### 3.3. Desenho experimental

O presente trabalho consistiu de cinco experimentos (EXPs) com o objetivo de avaliar o efeito de MT nas concentrações 0,05 (MT<sub>1</sub>), 0,1 (MT<sub>2</sub>) e 0,2 mM (MT<sub>3</sub>) sobre a competência oocitária e desenvolvimento embrionário. Os efeitos das concentrações de MT foram avaliados quando adicionados na pré-maturação induzida por butirolactona (EXP1), na maturação *in vitro*-MIV (EXP2) e no cultivo embrionário *in vitro*-CIV (EXP3). O EXP4 avaliou o efeito da MT quando adicionada nas etapas de maturação e de cultivo embrionário utilizando as melhores concentrações identificadas no EXP2 e EXP3. O EXP5 avaliou a criotolerância dos embriões gerados pelo tratamento com melhor resultado identificado no EXP4.

No EXP1 as concentrações de MT foram avaliadas em meio de pré-maturação com bloqueio da meiose por 24 horas com 100 µM (EXP1.1) ou por 12 horas com 50 µM (EXP1.2) de BULTI. No EXP2 as concentrações de MT foram avaliadas em meio de maturação e usadas por toda a MIV. No EXP3 as concentrações de MT foram avaliadas em meio de cultivo embrionário com renovação de 50% do meio no 3<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> dia pós-fecundação (EXP3.1) ou em meio único, sem renovação (EXP3.2). No EXP3 foi ainda avaliada a concentração de 0,05 mM adicionada por todo o cultivo (168 horas) ou com 72 horas ou 96 horas em meio único (EXP3.3). No EXP4 foi avaliado a combinação da melhor concentração de MT na MIV identificada no EXP2 (MMT<sub>2</sub> = 0,1 mM MT) e no CIV identificada no EXP3 (CMT<sub>1</sub> = 0,05 mM MT), constituindo os seguintes tratamentos: MMT<sub>0</sub>+CMT<sub>0</sub>, MMT<sub>0</sub>+CMT<sub>1</sub>, MMT<sub>2</sub>+CMT<sub>0</sub> e MMT<sub>2</sub>+CMT<sub>1</sub>. No EXP5 foi avaliada a melhor combinação de MT na MIV e no CIV (MMT<sub>2</sub>+CMT<sub>1</sub>) na criopreservação. A tabela 1 mostra os experimentos e os parâmetros avaliados.

Tabela 1- Experimentos (EXP) com metformina (MT) e parâmetros avaliados

EXP1		EXP2	EXP3		
EXP1.1. (X4)	EXP1.2. (X3)	(X6)	EXP3.1. (X3)	EXP3.2. (X6)	EXP3.3. (X4)
P <sub>100</sub> MT <sub>0-3</sub>	P <sub>50</sub> MT <sub>0-3</sub>	MMT <sub>0-3</sub>	CRMT <sub>0-3</sub>	CMT <sub>0-3</sub>	CMT <sub>0</sub> <sup>168</sup> , CMT <sub>1</sub> <sup>72</sup> , CMT <sub>1</sub> <sup>96</sup> e CMT <sub>1</sub> <sup>168</sup>
EXP4 (X6)			EXP5 (X14)		

MMT <sub>0</sub> +CMT <sub>0</sub> , MMT <sub>0</sub> +CMT <sub>1</sub> , MMT <sub>2</sub> +CMT <sub>0</sub> e MMT <sub>2</sub> +CMT <sub>1</sub>		MMT <sub>0</sub> +CMT <sub>0</sub> e MMT <sub>2</sub> +CMT <sub>1</sub>		
Parâmetros avaliados				
Desenvolvimento embrionário		Número de células e apoptose	Oxidação lipídica	Crio-resistência
Clivagem 48 hp-FIV	BLs (inicial, blastocisto, expandido, em eclosão e eclodido) 168 hp-FIV			
EXP1-5		EXP2, EXP3.2. e EXP5	EXP4	EXP5

P<sub>100</sub> e 50: doses (100 e 50 µM) de butirolactona I, MT<sub>0-3</sub>: concentração de 0, 0,05, 0,1 e 0,2 mM da metformina, MMT: MT durante a maturação: CRMT e CMT: a MT no cultivo com e sem renovação de 50% dos meios nos 3<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> dias de cultivo, X: número de repetições, BLs: blastocistos, hp-FIV: horas pós-fecundação *in vitro*.

Em cada experimento, o desenvolvimento para embriões clivados e estágios de blastocistos [inicial, blastocisto, expandido, em eclosão e eclodido (Bó e Mapletoft, 2018)] (Figura 2) foi observado 48 e 168 horas após a fecundação *in vitro* (FIV) bem com as análises específicas.

### 3.4. Preparação das soluções

#### 3.4.1. Cloridrato de 1,1-dimetilbiguanida (Metformina)

A solução de estoque EMT (100 mM) foi formada pela dissolução de 16,66 mg da MT (Cloridrato de 1,1-dimetilbiguanida; D150959) em 1 mL de água (W3500) (Al-Zaidan et al., 2017) (Lange et al., 2021; comunicação pessoal), em seguida a EMT foi diluída para 5, 10 e 20 mM nas EMT<sub>1</sub>, EMT<sub>2</sub> e EMT<sub>3</sub>, respectivamente, e todos ficaram na temperatura de 4°C até o dia de experimento, quando foram adicionados aos meios para atingir as concentrações experimentais.

#### 3.4.2. Meios da Pré-maturação *in vitro*

A BULTI (1 mg, 21765; Cayman, EUA) foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO)

(D5879) na concentração de 50 mM e mantida a -20°C (Lonergan et al., 2000).

Dois meios da Pré-maturação *in vitro* (Pré-MIV) foram preparados no momento do uso: P<sub>100</sub> [Meio de cultivo de tecido 199 (TCM-199) (Gibco Life Technologies<sup>Inc.</sup>, EUA), 3 mg/mL de albumina de soro bovino (ASB) (A9418) e 100 µM da BLI] (Lonergan et al., 2000) e P<sub>50</sub> [Meio de MIV: TCM-199, 20 µg/mL de FSH (Foltropin®-V; Vetoquinol, Brasil), 1 µg/mL de β-Estradiol (E8875), 0,36 mM de piruvato de sódio (P2256), 100 UI + 50 µg por mL de penicilina + estreptomicina (P4333), 5% de soro fetal bovino (SFB) (A4766801; Gibco Life Technologies<sup>Inc.</sup>, EUA) e 50 µM de BLI] (Hashimoto et al., 2002; Maziero et al., 2020).

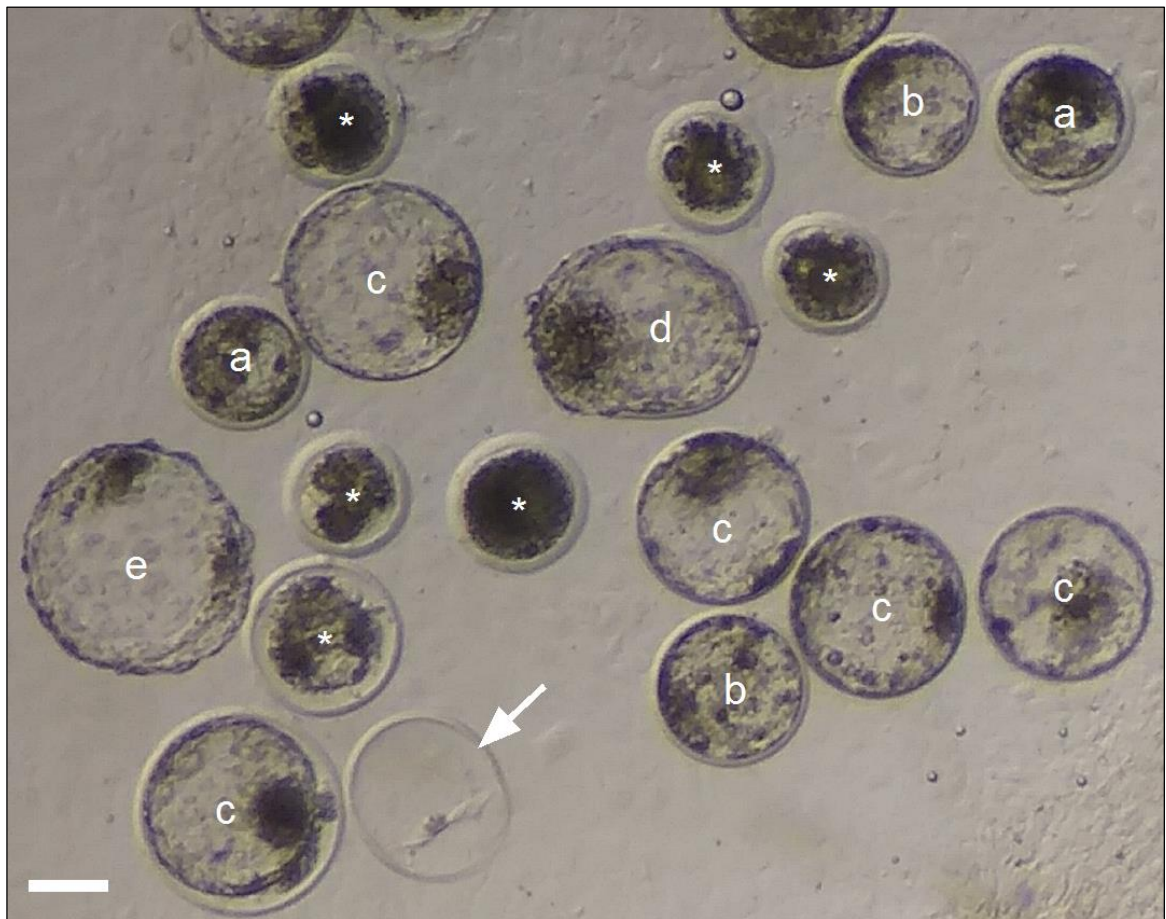


Figura 2- A classificação morfológica de estágios de blastocistos 168 horas após a fecundação. Os blastocistos categorizados em a: inicial, b: blastocisto, c: expandido (zona pelúcida mais fina e blastocelo maior em comparação com as categorias prévias), d: em eclosão (um parte na zona pelúcida que forma saída do embrião), e: eclodido (embrião liberado da zona pelúcida, seta), \*: oócitos não fecundados e embriões degenerados). Esteriomicroscópio (SMZ 645 Zoom; Nikon, Japão) Magnificação X20. A medida representa 100 µm.

### 3.4.3. Sonda de lipídios totais e oxidados

A BODIPY<sup>581/591</sup>C<sub>11</sub> cora os lipídios oxidados (floreescência verde) e não oxidados (vermelho) (Pap et al., 1999). A solução de 5 mM foi preparado com adição de 400 µL de DMSO para 1 mg da sonda (D3861; Invitrogen, EUA) (E-BODIPY) e armazenada a -20°C. A solução do trabalho (T-BODIPY; 500 µM) foi preparada de E-BODIPY com tampão fosfato-salino (PBS) e colocada no 4°C (Wang et al., 2022).

### 3.4.4. Meios de vitrificação e aquecimento

O meio de manutenção foi preparado com TCM 199 Hepes (12340030-01; Gibco Life Technologies<sup>Inc.</sup>, EUA), 10% de SFB, 0,22 mM de piruvato de sódio e penicilina/estreptomicina. Esse meio foi acrescentado de 7,5% de etilenoglicol (Código: 102466) e 7,5% de DMSO para formar o meio de criopreservação 1 (CRIO 1), ou de 16% de etilenoglicol, 16% de DMSO e 0,5 M de sacarose (S1888) para o CRIO 2. A solução de aquecimento foi composta de meio de manutenção e 11,7% de sacarose (Oliveira et al., 2020).

## 3.5. Produção in vitro de embriões

Os ovários foram obtidos do frigorífico Fripai na cidade de Juiz de Fora-Minas Gerais, e transportados na solução de 0,9% de NaCl e antibiótico (Penicilina/Estreptomicina) na temperatura de 37°C. Depois da punção dos folículos antrais (3-6 mm de diâmetro), os complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) foram selecionados dependendo do número e da compactação das camadas celulares (≥3) e da cor da ooplasma (escura e homogênea), lavados por três vezes em TCM-199 acrescentado de 0,36 mM de piruvato de sódio, penicilina/estreptomicina e 5% SBF e submetidos à Pré-MIV no EXP1, e diretamente à MIV (24 horas) nos demais experimentos.

Antes do final da maturação, uma dose de 2x10<sup>6</sup> espermatozoide/mL em 50 µL do meio Fert-Tyrode's *medium base, albumin, lactate and Pyruvate* (TALP) [20 µg/mL de heparina (H3393) e 6 mg/mL de fração V de ASB sem ácidos graxos (Código: 10775835001)] foi preparada conforme segue: o conteúdo de uma palheta de sêmen

(*Bos taurus indicus*) descongelado no banho-maria na 37,5°C/30 segundos foi centrifugado duas vezes: uma para a separação (dois gradientes: 45% e 90% de percoll (P4937) 200 µL de cada) e a outra para a lavagem (pellet formada é lavada em 400 µL do meio Fert-TALP) com 5433 e 687 força centrífuga relativa (RCF) por 5 e 3 minutos. Os oócitos maturados foram co-incubados com os espermatozoides por 18 horas. Os zigotos presumíveis foram desnudos parcialmente pela pipetagem e colocados em gotas de 100 µL de meio de cultivo *in vitro* (CIV) constituído de fluido sintético do oviduto (SOF) suplementado com 3% de SBF e 4 mg/mL de fração V de ASB sem ácidos graxos.

As placas (35 mm; Corning®) foram preenchidas com o óleo mineral e o cultivo embrionário foi conduzida com 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> no ar e 100% de umidade, 50% de volume do meio do CIV foi renovado nas 72 e 144 horas após a fecundação (Camargo et al., 2019), exceto quando mencionado de maneira diferente (EXP3.3, EXP4 e EXP5).

### 3.6. Avaliação da qualidade de blastocistos

Os blastocistos foram fixados em 4% paraformaldeído por 30 minutos e preservados na temperatura de 4°C em PBS. O ensaio de *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP- digoxigenin nick end-labeling* (TUNEL) foi conduzido com um kit comercial (DeadEnd Fluorimetric TUNEL System; Promega, Brasil). No dia da análise, os embriões foram permeabilizados em Triton (0,2%) por cinco minutos, colocados em tampão de equilíbrio por 10 minutos e em seguida no tampão da incubação por uma hora [88%, 2,5% e 0,5% de Tampão de equilíbrio, mix de nucleotídeo e enzima de desoxinucleotidil-terminal transferase (rTdT), respectivamente], menos o controle negativo que foi incubado sem rTdT, enquanto o controle positivo foi antecipadamente colocado por 15 minutos em DNase. Depois de uma lavagem na solução de salino-citrato de sódio (SSC) por 15 minutos, os blastocistos foram montados na lâmina, corados com *4'6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI) (Vector Laboratories<sup>Inc.</sup>, EUA), cobertos pela lamínula e avaliados sob microscópio invertido com fluorescência (EVOS M5000 microscope; Thermo Fischer, EUA) com filtros de 357/447 e 470/525 nanômetros, colorações azul e verde, respectivamente. A Figura 3 ilustra imagens de blastocistos com a coloração DAPI e TUNEL.

As fotos foram analisadas com ImageJ software (ImageJ1.54d; National Institutes of Health, Wisconsin, EUA).

O índice da apoptose representou a porcentagem das células positivas de TUNEL sobre o total de células contadas (Camargo et al., 2019). Os embriões degradados após a coloração foram eliminados da contagem.

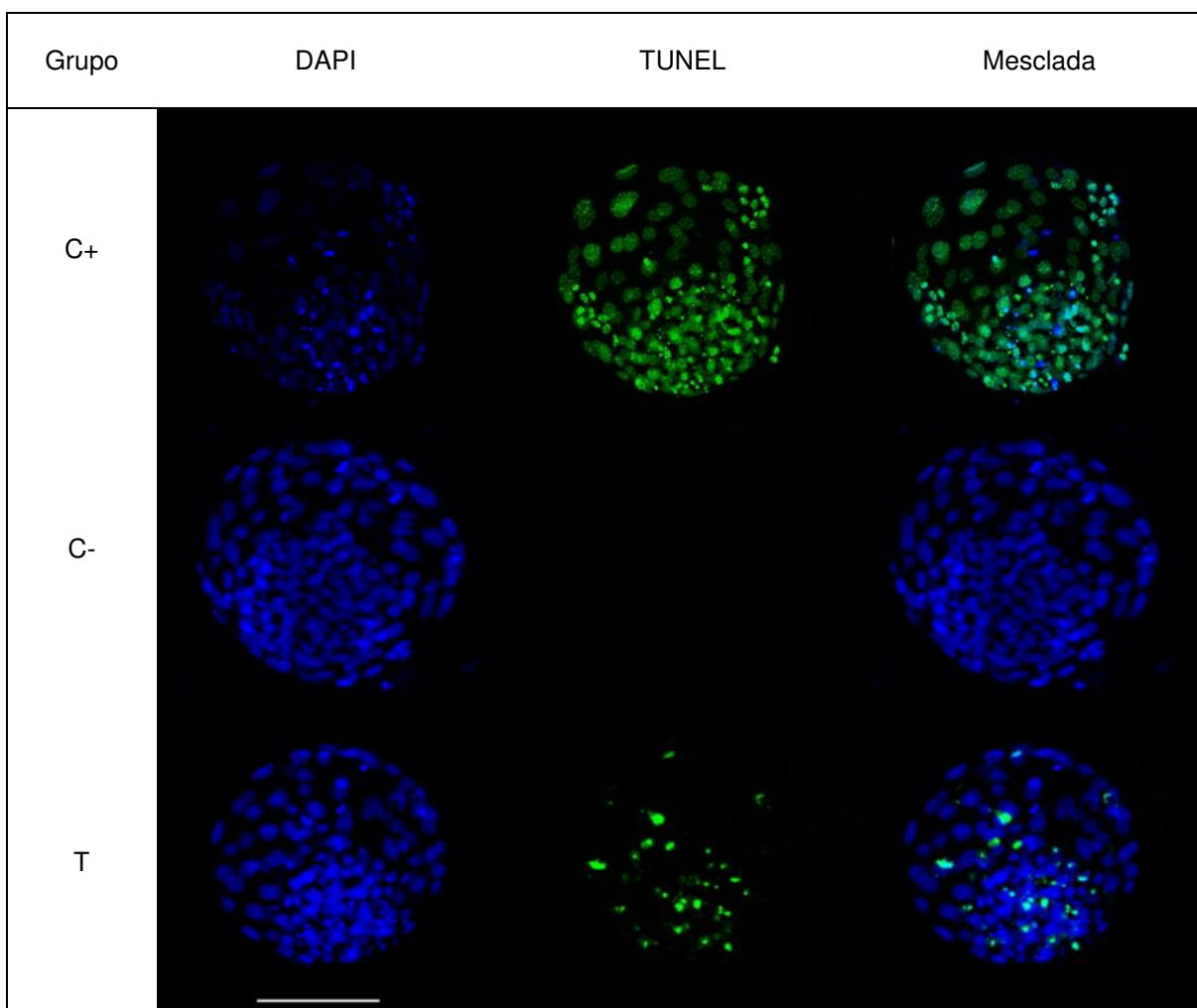


Figura 3- Blastocistos com a coloração DAPI e TUNEL. DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol, TUNEL: *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP- digoxigenin nick end-labeling*, 7-10 embriões por ensaio foram utilizados para C+ e C- do TUNEL, T: um blastocisto de tratamentos. A medida representa 50  $\mu$ M. x20.

### 3.7. Distribuição e oxidação de lipídios

Foi adicionado 1  $\mu$ L de T-BODIPY para cada gota de cultivo no momento da avaliação de formação de blastocistos. Após a incubação por 30-60 minutos, os embriões foram mantidos entre lâmina e lamínula com um volume mínimo de meio.

Imagens da distribuição dos lipídios não reduzidos (585/624 nanômetros) e oxidados (470/525 nanômetros) foram obtidas em microscópio invertido de fluorescência (EVOS M5000). A área de embrião foi medida usando os seguintes comandos no ImageJ: *ImageJ>Open* (duas fotos da fluorescência), *Analyze>Set Scale* (Transformação de pixel para  $\mu\text{m}$  por uma medida conhecida), *Process>Subtract Background (50 pixels)*, *Image>Merge Channels>red* (lipídios não reduzidos)>*green* (lipídios oxidados), *Tools>Freehand selections* (a foto composta)>*Measure*.

Em seguida, cada foto de fluorescência foi medida por um macro específico desenvolvido no laboratório da reprodução animal, baseando no trabalho dos Shihan et al. (2021), Nishad et al. (2023) e Zhang e Wang (2023) e a área ocupada pelos lipídios totais foi calculada como a soma de áreas vermelhas + verdes/área do embrião%, enquanto a média da fluorescência da cada cor foi calculada com os comandos seguintes: *Measurements>Mean gray value*, *Process>Subtract Background> Rolling ball radius 50.0 pixels*, *Freehand selection>Measure* (um para o embrião e outro para o plano do fundo), e a fluorescência foi calculada como a do embrião menos a do plano do fundo. Finalmente, a oxidação dos lipídios representou a fluorescência da cor verde/a soma da fluorescência de duas cores% (Wang et al., 2022; Shihan et al., 2021) (Figura 4).

### 3.8. Vitrificação

No fim do CIV, pools de 5-7 blastocistos de alta qualidade com blastocèle evidente e zona pelúcida intacta classificados como grau 1, foram estabilizados no meio de manutenção por 7 minutos. Em seguida, foram colocados nos meios CRIO 1 e CRIO 2 por 90 e 30 segundos, respectivamente (gotas de 50  $\mu\text{L}$ ), e transferidos para um aparato da vitrificação (29934, Vitrific; WTA, Brasil) (a ponta curvada igual à letra c), que foi mergulhado em nitrogênio líquido, fechado com tampa específica e mantido a  $-197^{\circ}\text{C}$ . Uma semana depois, os blastocistos foram colocados na solução de aquecimento por 6 minutos, lavados e cultivados em grupos de 20-25 para verificar a re-expansão após 0, 1, 4 e 24 e a eclosão nas 24 e 48 horas (Oliveira et al., 2020).

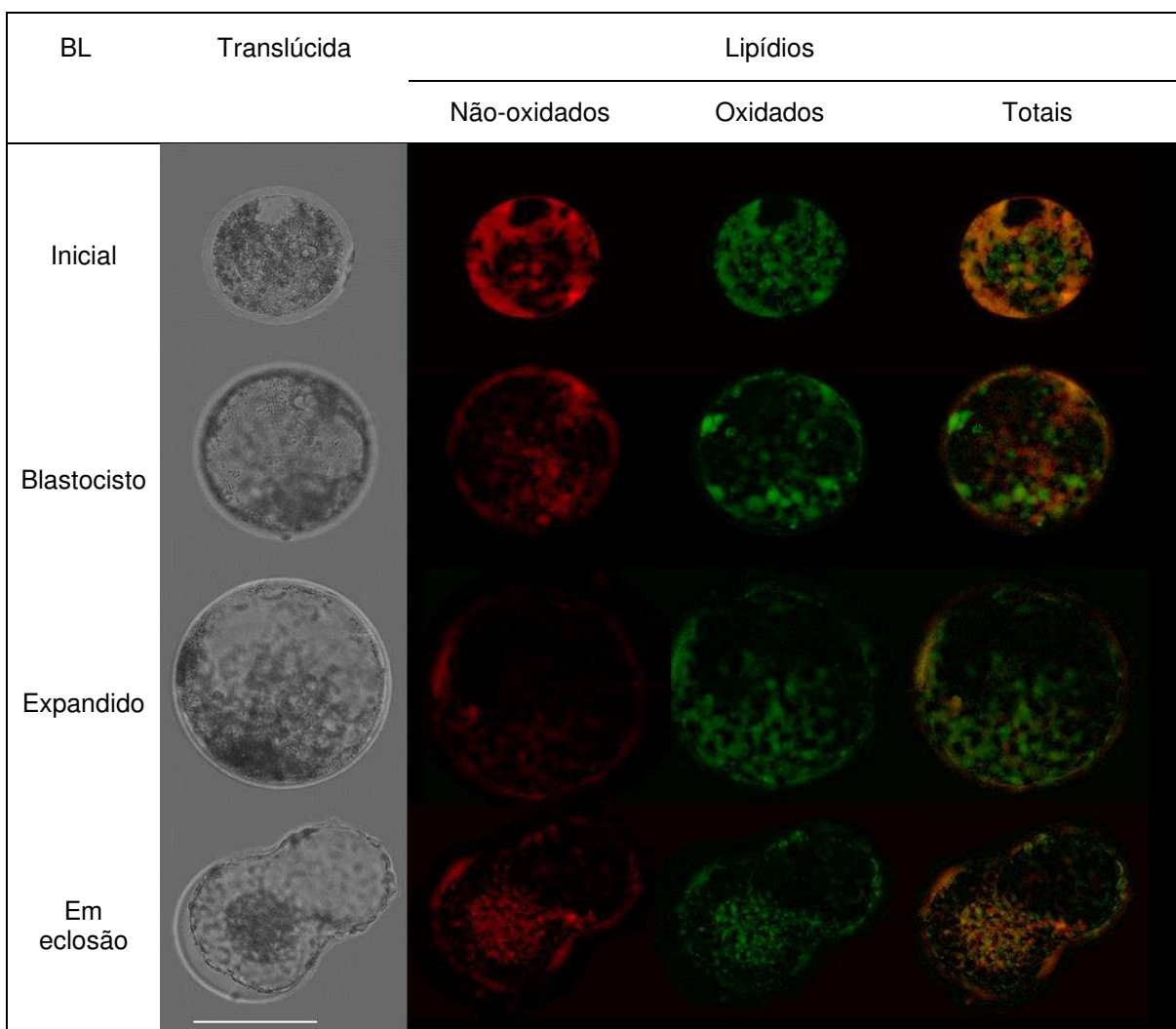


Figura 4- A área e a oxidação dos lipídios em embriões bovinos. Blastocistos em estágios diferentes de desenvolvimento corados com BODIPY<sup>581/591</sup>C<sub>11</sub>. As colorações vermelhas e verdes representam os lipídios não reduzidos e os reduzidos pelas espécies reativas de oxigênio, a medida (linha branca) igual à 50 µm. Magnificação X20.

### 3.9. Análise estatística

Dados foram analisados por regressão logística (desenvolvimento embrionário e índice de apoptose) e análise de variância para modelos mistos com teste de médias (contagem de células e oxidação lipídica), e os qualitativos foram comparados com Qui-quadrado, usando o programa estatístico SAS Statistical Software (versão 9.1). Resultados são apresentados como média±EPM e diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. EXP1. (Metformina-Pré-Maturação)

A finalidade desse estudo foi avaliar o efeito da MT em oócitos em estágio de VG, ainda em crescimento, sobre a capacidade de produzir blastocistos após a fecundação *in vitro*. Oócitos podem ser mantidos em VG com uso de substâncias como a BULTI, uma inibidora de cdks, permitindo a pré-maturação oocitária para a finalização do crescimento do oócito (Kubelka et al., 2000; Lonergan et al., 2000; Hashimoto et al., 2002; Adona et al., 2008).

#### 4.1.1. EXP1.1.

As taxas de produção de blastocistos foram baixas, com os grupos de P<sub>100MT0</sub> e P<sub>100MT1</sub> não produzindo blastocistos (Tabela 2). As baixas taxas de produção de blastocistos observados neste estudo não permitem uma conclusão do efeito da MT na pré-maturação, pois os dados não proporcionam uma análise robusta, principalmente pela ausência de embriões no grupo controle. De fato, a ausência de blastocistos no grupo controle (P<sub>100MT0</sub>) indica que o sistema de pré-maturação com 100 µM de BULTI por 24 horas adotado neste estudo não foi adequado, similar ao observado por Maziero et al. (2020). Por outro lado, estudo anterior mostrou que este mesmo tratamento na pré-maturação de oócitos bovinos é capaz de gerar blastocistos, apesar de reduzir a taxa de blastocistos comparado com oócitos sem pré-maturação, e que doses menores podem ser mais eficientes (Adona et al. 2008). Lonergan et al., (2000) também encontraram efeito positivo de 100 µM de BULTI na produção de blastocistos bovinos.

Tabela 2- Desenvolvimento pós-fecundação de oócitos submetidos ao bloqueio da meiose por 24 horas com metformina

*Grupo	ZP	Clivagem	BL Total
P <sub>100MT0</sub>	95	55,1±12,2	0±0
P <sub>100MT1</sub>	97	66,6±5,1	0±0
P <sub>100MT2</sub>	95	67,1±6,8	7±3,1
P <sub>100MT3</sub>	94	53,1±15	1,8±1,8

\*ZP: o número de zigotos presumíveis, BL: blastocisto, P<sub>100</sub>MT<sub>0, 1, 2 e 3</sub>: meio da pré-maturação *in vitro* com 100 µM da butirolactona I e 0, 0,05, 0,1 e 0,2 mM da metformina respectivamente, os dados são expressos em média%±erro padrão da média (EPM).

A BULTI causa alterações semelhantes às apoptóticas (Saraste e Pulkki, 2000) nas membranas nuclear e celular oocitárias e deforma as ligações da corona radiata-olema, e conseqüentemente, na estrutura (Lonergan et al., 2003) e na distribuição das mitocôndria nos oócitos maturados (Adona et al., 2008). Realmente, a BULTI provoca morte programada nas células malignas pancreáticas (Wada et al., 1998) e nas de pulmão e intestino humanas e degenera a proteína p21 (proteína um interagida com o inibidor da cinase dependente de ciclina) separadamente da inativação das cdk's (Sax et al., 2002), e essa p21 regula a quebras de fita dupla ácido desoxirribonucleico (DNA) ocorrida fisiologicamente durante o crescimento oocitário em bovinos (Wang et al., 2020).

De acordo com os Kubelka et al. (2000), a ASB impede a suspensão da meiose induzida pela BULTI, e isso se for, leva a uma degeneração causada pelo tempo prolongado da maturação (Yang e Rajamahendran, 2002), que não foi detectada pelos Hashimoto et al. (2002), Lonergan et al. (2000) e Imai et al. (2002).

No presente trabalho como nos estudos dos Kubelka et al. (2000) e Lonergan et al. (2000), o DMSO foi utilizado para dissolver a BUTLI, formando 0,2% do meio da Pré-MIV, sendo uma concentração segura para a PIVE (Ynsaurralde-Rivolta et al., 2020).

Os pontos supraditos, indicam que as degradações resultantes neste experimento e no trabalho dos Maziero et al (2020) foram causados pela dose de 100 µM da BULTI.

#### 4.1.2. EXP1.2.

Devido aos achados anteriores que mostraram que 100 µM de BULTI por 24 horas prejudicaram a competência oocitária, uma dose de 50 µM de BULTI por 12 horas (P<sub>50</sub>) foi utilizada para avaliar o efeito da MT na pré-maturação. Observou-se que esta formulação na pré-maturação permitiu a produção de blastocistos no grupo controle (Tabela 3) com taxa semelhante a encontrada na literatura (Lonergan et al., 2000; Hashimoto et al., 2002), proporcionando uma análise comparativa mais eficiente

entre os tratamentos. Os resultados mostram que a adição da metformina na pré-maturação dos oócitos não teve efeito ( $P>0,05$ ) na produção de blastocistos.

Tabela 3- Efeito da adição da metformina durante a pré-maturação por 12 horas na produção *in vitro* de embriões

*Grupo	ZP	Clivagem	BL Total	Estágios de blastocistos				
				BL Inicial	BL Blastocisto	BL Expandido	BL Em eclosão	BL Eclodido
P <sub>50</sub> MT <sub>0</sub>	85	44,8±11,5	21,2±2,2	3,5±2	2,3±2,3	12,9±1,3	1,1±1,1	1,1±1,1
P <sub>50</sub> MT <sub>1</sub>	88	44,1±4	15,5±6,8	0±0	6,6±3,1	7,8±2,7	1±1	0±0
P <sub>50</sub> MT <sub>2</sub>	99	43,4±5,1	24,2±0,4	0±0	8±2,6	16,2±2,7	0±0	0±0
P <sub>50</sub> MT <sub>3</sub>	96	53,3±2,7	28,1±2	2,2±2,2	8,2±4,1	15,8±2,4	0,9±0,9	0,9±0,9

\*ZP: o número de zigotos presumíveis, BL: blastocistos, P<sub>50</sub>MT<sub>0</sub>, 1, 2 e 3: meio da pré-maturação *in vitro* com 50 µM da butirolactona I e 0, 0,05, 0,1 e 0,2 mM da metformina, respectivamente, os dados são expressos em média±erro padrão da média (EPM).

Considerando que na pré-maturação os oócitos ainda estão em VG, na fase final do crescimento, os resultados desse estudo sugerem a rejeição da hipótese de que a MT poderia melhorar o desenvolvimento após a fecundação por meio de moderar o excesso dos radicais livres no ambiente *in vitro* (El-Mir et al., 2000; Owen et al., 2000; Wheaton et al., 2014). Contudo, mais estudos podem ser necessários para confirmar os efeitos das concentrações da BULTI no nível molecular e como a metformina pode atenuá-los.

A metformina não melhorou o desenvolvimento após a fecundação de oócitos submetidos ao bloqueio da meiose, também o passo da pré-maturação precisa de mais estudos.

#### 4.2. EXP2 (Metformina-Maturação)

A finalidade desse estudo foi avaliar o efeito da MT em oócitos em maturação, após o crescimento, sobre a capacidade de produzir blastocistos após a fecundação *in vitro*. O desenvolvimento de oócitos fecundados para embriões clivados, BL total, inicial, em eclosão ou eclodido não mostrou diferença significativa ( $P>0,05$ ). No MMT<sub>2</sub> a proporção de BL blastocisto foi a menor ( $P<0,05$ ) entre os grupos e a taxa de BL

expandido foi maior comparada com MMT<sub>0</sub> (P<0,05) (Tabela 4), enquanto esses dados foram semelhantes (P>0,05) entre o controle, MMT<sub>1</sub> e MMT<sub>3</sub>.

Tabela 4- A produção de embriões desenvolvidos de oócitos bovinos maturados com três concentrações da metformina

*Grupo	ZP	Clivagem	BL total	Estágios de blastocisto				
				BL Inicial	BL Blastocisto	BL Expandido	BL Em eclosão	BL Eclodido
MMT <sub>0</sub>	139	78,8±3,2	46,4±7,1	10,9±2,0	14,5±3,4 <sup>a</sup>	18,1±4,8 <sup>b</sup>	1,39±1,3	1,39±1,3
MMT <sub>1</sub>	142	76,0±3,3	48,0±4,5	12,7±2,8	7,3±2,7 <sup>a</sup>	26,5±5,0 <sup>a,b</sup>	0,83±0,8	0,57±0,5
MMT <sub>2</sub>	143	75,5±2,9	40,8±2,8	9,3±2,0	3,3±1,8 <sup>b</sup>	27,5±1,8 <sup>a</sup>	0,0±0,0	0,69±0,6
MMT <sub>3</sub>	151	76,6±3,6	44,3±5,0	9,6±1,6	8,8±3,0 <sup>a</sup>	24,6±14,0 <sup>a,b</sup>	0,72±0,7	0,52±0,5

\*ZP: o número de zigotos presumíveis, BL: blastocisto, MMT<sub>0, 1, 2 e 3</sub>: as doses da metformina de 0, 0,05, 0,1 e 0,2 mM respectivamente durante a maturação *in vitro*. Os dados são apresentados como média±erro padrão da média (EPM), <sup>a, b</sup>: as letras sobrescritas dentro da mesma coluna indicam diferença significativa (P<0,05).

Em outras cinco repetições, a maturação foi realizada com 0 e 0,1mM da MT (que apresentou a maior taxa de blastocistos expandidos) (99 e 77 oócitos, respectivamente) e cada 4-5 blastocistos/grupo foram submetidos ao TUNEL (Figura 5).

A contagem das células totais e apoptóticas, além da taxa de apoptose foram maiores (P<0,05) no grupo MMT<sub>2</sub> em comparação com controle (Tabela 5).

Tabela 5- Efeito de suplemento da metformina no meio da maturação na viabilidade do embriões produzidos

*Grupo	BLs corados (N)	Blastômeros (N)		Taxa de apoptose (%)
		Totais	Apoptóticos	
MMT <sub>0</sub>	18	138,33±11,12 <sup>b</sup>	19,05±2,97 <sup>b</sup>	13,20±1,54 <sup>b</sup>
MMT <sub>2</sub>	22	173,77±7 <sup>a</sup>	33,95±3,76 <sup>a</sup>	19,45±2,12 <sup>a</sup>

\*MMT<sub>0 e 2</sub>: maturação *in vitro* sem ou com 0,1 mM da metformina, N: número, BLs: blastocistos, os resultados foram expressos em média±erro padrão da média (EPM), <sup>a, b</sup>: os sobrescritos diferentes na mesma coluna indicam um valor de P<0,05.

Neste experimento, no grupo tratado na maturação com 0,1 mM da MT a proporção de blastocistos expandidos foi maior em comparação com o grupo não tratado, e este estágio embrionário é o preferido para a vitrificação, devido à sua crioresistência superior às outras estruturas embrionárias (Mahmoudzadeh et al., 1995; González-Rodríguez et al., 2022). Anteriormente, Hong et al. (2009) não encontraram efeito da  $10^{-3}$  mM da metformina na produção de embriões, mas o desenvolvimento foi avaliado somente até a transição materno-embrionária.

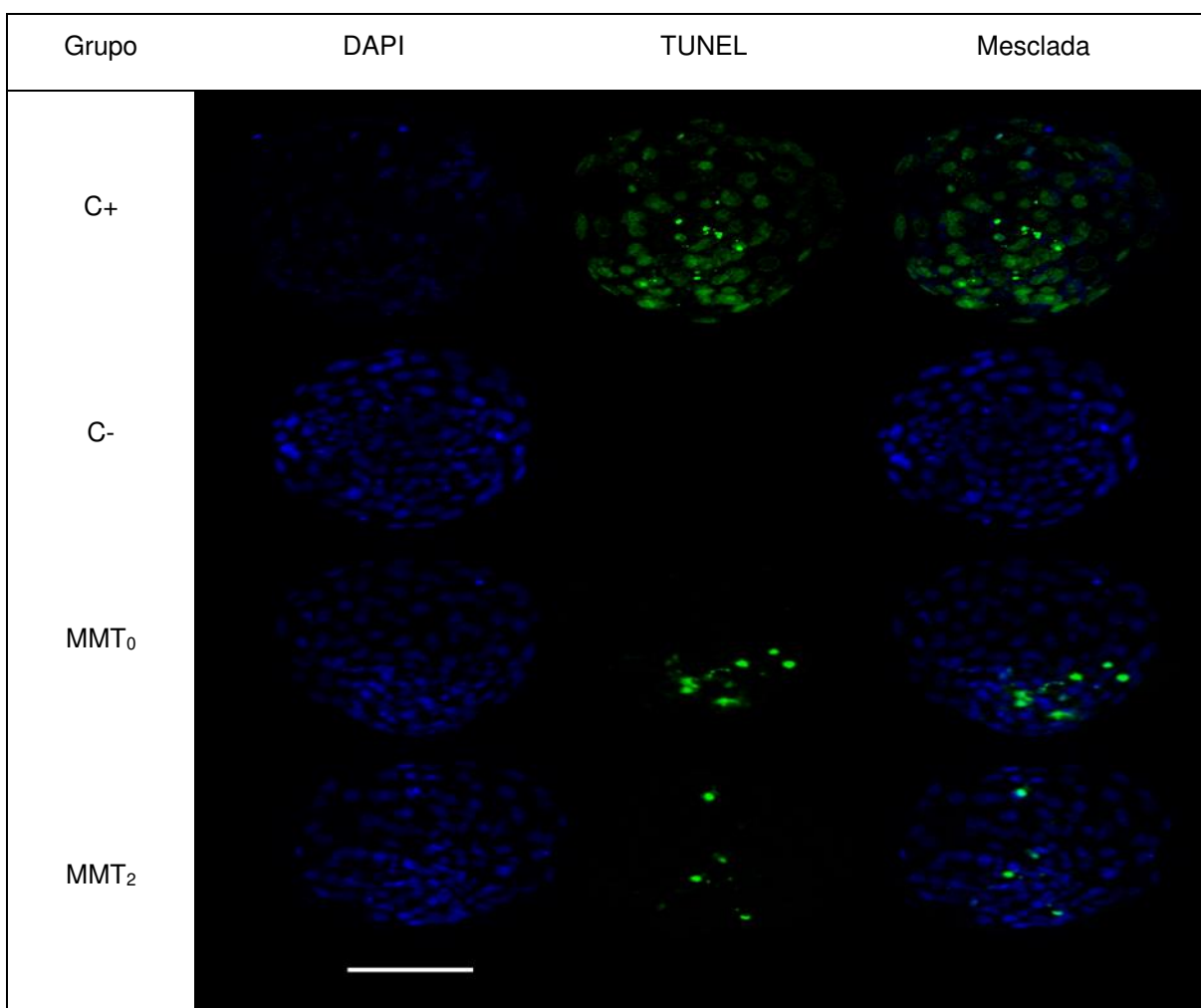


Figura 5- Células coradas para avaliar a viabilidade de blastocistos produzidos de oócitos maturados com metformina. DAPI: *4'6-diamidino-2-phenylindole*, TUNEL: *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP- digoxigenin nick end-labeling*, C+ e C-: controle de ensaio incubado e não com enzima de *desoxinucleotidil-terminal transferase*, MMT<sub>0</sub> e <sub>2</sub>: embriões desenvolvidos após a fecundação de oócitos maturados na presença de 0 e 0,1 mM da metformina. A medida representa 50  $\mu$ M. x20.

A MT, que equilibra o balanço agentes-oxidantes/antioxidantes sem interferência direta com os radicais livres (Ouslimani et al., 2005) ou com os lipídios (Dolowy et al.,

2021), não apresentou efeito indesejável na produção de embriões, ou como no caso da utilização do SOD (Luvoni et al., 1996; Ali et al., 2003) e da catalase (Rocha-Frigoni et al., 2016) e de substâncias lipofílicas, incluindo o alfa-tocoferol (Dalvit et al., 2005), a carnitina (Chankitisakul et al., 2013) e keto-carotenoide (cantaxnatina) (Shebli, 2018).

No presente trabalho, a MT otimizou o número de blastômeros, sem mudar os resultados totais da PIVE, sendo achados semelhantes com o uso da GSH (Curnow et al., 2010), do resveratrol (Takeo et al., 2014), da nicotinamida (El-Sheikh et al., 2020) e da forskolina (Quintão, 2023). Outros estudos, apesar de comprovarem otimização na produção de embriões, utilizando eliminadores de EROs como a epigalocatequina galato (Huang et al., 2018), a melatonina (Zhao et al., 2018), a carnosina (Idrissi et al., 2022), a gamma-oryzanol (Davoodian et al., 2024), e a limonina (Jiao et al., 2024), não categorizaram os blastocistos, como no presente experimento. Destaca-se a importância dessa classificação na avaliação do sistema da produção de embriões e na prática (Bó e Mapletoft, 2018).

O melhoramento observado na produção e na viabilidade de embriões gerados após a maturação oocitária com a quercetina (Sovernigo et al., 2017), a licopeno (Chowdhury et al., 2017), o piceid (Khan et al., 2017) e a BTZO-1 (Aboelenain et al., 2020) foi depois de um tempo estendido de cultivo embrionário; por outro lado no presente trabalho, a MT contribuiu no avanço dos oócitos após a fecundação para estágios de blastocistos considerados de maior crio-tolerância de acordo com Niemann et al. (1982) e Hasler et al. (1995).

A metformina avançou o desenvolvimento embrionário, favorecendo o aumento da produção de blastocistos expandidos, o qual está de acordo com o objetivo do nosso trabalho na vitrificação; porém, a ação da metformina no aumento de número de blastômeros e na ocorrência da apoptose precisa de mais investigação, com foco nas possíveis alterações na atividade de AMPK (Tosca et al., 2007; Pikiou et al., 2015) e genes relacionados com a proliferação celular (Sugimura et al., 2017), além de verificar se a MT induziria a proliferação e a morte nas células em mecanismos separados ou correlacionados nas duas linhagens celulares embrionárias (Gjorret et al., 2003).

### 4.3. EXP3 (Metformina-Cultivo)

Este experimento avaliou o desenvolvimento de embriões cultivados em meio acrescentado da MT em três protocolos de CIV.

#### 4.3.1. EXP3.1. (Renovação de meio)

Este estudo foi conduzido com renovação de 50% do meio de cultivo no 3º e 6º dia pós-fecundação em todos os grupos. O desenvolvimento de zigotos a partir de embriões clivados ( $P>0,05$ ) não foi afetado pela MT, enquanto a proporção de blastocisto total no CRMT<sub>2</sub> foi maior ( $P<0,05$ ) em comparação com CRMT<sub>0</sub> e CRMT<sub>1</sub>, e não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre o controle e CRMT<sub>1</sub> e CRMT<sub>3</sub>. As porcentagens das categorias morfológicas de blastocistos foram semelhantes ( $P>0,05$ ) entre os grupos (Tabela 6).

Tabela 6- Produção de embriões bovinos desenvolvidos no meio de cultivo renovado nos 3º e 6º dias e suplementado com metformina

*Grupo	ZP	Clivagem	BL total	Estágios de blastocistos		
				BL inicial	BL blastocisto	BL expandido
CRMT <sub>0</sub>	57	80,7±2,8	12,2±1,4 <sup>b</sup>	8,7±1,4	0	3,5±1,4
CRMT <sub>1</sub>	59	76,3±5,7	15,5±3 <sup>b</sup>	8,5±1,4	5,3±2,6	1,6±1,3
CRMT <sub>2</sub>	57	78,5±2,8	34,6±4,9 <sup>a,c</sup>	18,1±9	10,1±1,6	6,3±2,6
CRMT <sub>3</sub>	58	70,3±4,4	20,3±6 <sup>b,c</sup>	10,3±2,3	6,6±3,6	3,3±1,3

\*ZP: número de zigotos presumíveis, BL: blastocisto, CRMT<sub>0, 1, 2 e 3</sub>: cultivo *in vitro* com renovação do 50% do meio 72 e 144 horas após a fecundação com 0, 0,05, 0,1 e 0,2 mM da metformina, respectivamente. Os resultados são expressos em média±erro padrão da média (EPM), <sup>a, b, c</sup>: as letras sobrescritas dentro da mesma coluna indicam diferença significativa ( $P<0,05$ ).

#### 4.3.2. EXP3.2. (Sem renovação de meio)

Este estudo foi conduzido sem renovação do meio por todo o período de cultivo (meio único) em todos os grupos. A taxa de clivagem ( $P>0,05$ ) neste experimento não mostrou diferença significativa ( $P>0,05$ ). A produção de blastocistos totais foi o superior ( $P<0,05$ ) no CMT<sub>1</sub>, e não diferenciou entre o controle (CMT<sub>0</sub>) ( $P>0,05$ ) e os

outros tratamentos. A proporção de BL expandido foi o menor ( $P>0,05$ ) no CMT<sub>2</sub>, e de mais estágios de blastocistos não mostraram nenhuma diferença significativa ( $P>0,05$ ) (Tabela 7).

Tabela 7- O desenvolvimento de zigotos cultivados com metformina para estruturas embrionárias 168 horas após a fecundação *in vitro*

*Grupo	ZP	Clivagem	BL total	Estágios de blastocistos				
				BL inicial	BL blastocisto	BL expandido	BL em eclosão	BL eclodido
CMT <sub>0</sub>	106	90,9±2	43,6±7,3 <sup>b,c</sup>	0,8±0,7	12,9±4,2	24,5±7,7 <sup>a</sup>	1,1±1	3,3±1,5
CMT <sub>1</sub>	107	88,4±1,4	60,3±2,5 <sup>a</sup>	0	20,9±2,6	32,3±5,3 <sup>a</sup>	5±1,7	1,9±0,9
CMT <sub>2</sub>	111	85,3±3	30,4±3,7 <sup>c</sup>	1,4±1,3	13±1,9	11,1±2,3 <sup>b</sup>	2,8±1,8	1,9±1,1
CMT <sub>3</sub>	118	87,9±2,8	48,1±6,1 <sup>b</sup>	2,8±1,9	13,4±2,9	23±4 <sup>a</sup>	6,8±2,1	1,8±1

\*ZP: número de zigotos presumíveis, BL: blastocisto, CMT<sub>0</sub>, 1, 2 e 3: cultivo *in vitro* com 0, 0,05, 0,1 e 0,2 mM da metformina. Os dados são citados como média±erro padrão da média (EPM), <sup>a, b, c</sup>: as letras diferentes na mesma coluna são de resultados com diferença significativa ( $P<0,05$ ).

Em seguida, os blastocistos foram fixados e submetidos aos ensaio de TUNEL e DAPI (Figura 6).

O número total de blastômeros foi maior ( $P<0,05$ ) no grupo de controle em comparação com CMT<sub>2</sub> e foi semelhante ( $P>0,05$ ) entre os grupos de tratamento. No CMT<sub>0</sub>, o índice de apoptose foi menor ( $P<0,05$ ) em comparação com CMT<sub>1</sub> e CMT<sub>2</sub> e não diferenciou ( $P>0,05$ ) do CMT<sub>3</sub> (Tabela 8).

Tabela 8- A ocorrência da apoptose em blastocistos produzidos de embriões cultivados com a metformina

*Grupo	BL(N)	Células totais (N)	Células apoptóticas (N)	Índice de apoptose (%)
CMT <sub>0</sub>	28	114,4±8,1 <sup>a</sup>	25±2,3	24,5±2,5 <sup>c</sup>
CMT <sub>1</sub>	37	106,2±6,8 <sup>a,b</sup>	26,5±2	26,4±1,9 <sup>a,b</sup>
CMT <sub>2</sub>	18	90,2±4,6 <sup>b</sup>	24,7±1,8	27,9±1,9 <sup>a</sup>
CMT <sub>3</sub>	26	101,5±5,4 <sup>a,b</sup>	24,3±2,9	22,9±2 <sup>b,c</sup>

\*BL: blastocistos analisados, N: número, CMT<sub>0</sub>, 1, 2 e 3: as concentrações de metformina de 0, 0,05, 0,1 e 0,2 mM no meio de cultivo *in vitro*. Os dados são escritos como média±Erro padrão da média (EPM), <sup>a, b, c</sup>: as letras diferentes na mesma coluna são de dados com diferença significativa ( $P<0,05$ ).

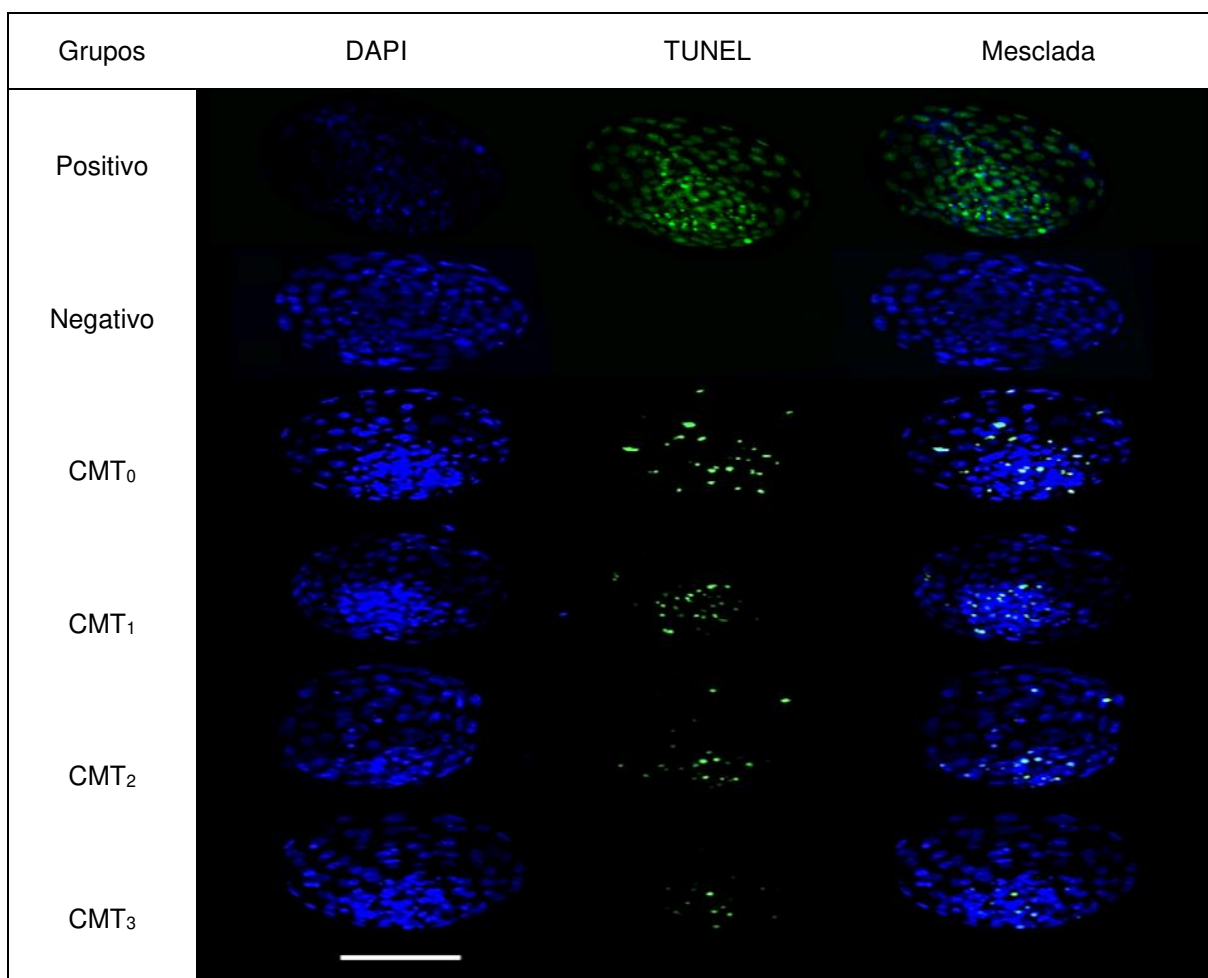


Figura 6- Blastômeros totais e apoptóticos em blastocistos produzidos de meio de cultivo acrescentado de metformina. DAPI: *4'6-diamidino-2-phenylindole*, TUNEL: *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP- digoxigenin nick end-labeling*, 5 blastocistos para cada controle Positivo e Negativo do TUNEL, CMT<sub>0-3</sub>: tratamento com 0, 0,05, 0,1 e 0,2 mM da metformina durante o cultivo. (A linha branca= 50  $\mu$ M) x20. (EVOS M5000 microscope; Thermo Fischer, EUA).

#### 4.3.3. EXP3.3. (Duas partes de cultivo)

Este estudo avaliou a concentração de 0,05 mM de MT (que resultou em melhores taxas de blastocistos no EXP3.2) adicionada por todo o cultivo (168 horas) ou com 72 ou 96 horas de cultivo em meio único. Os zigotos continuaram o cultivo até 72 horas após a fecundação, quando o desenvolvimento para embriões de 2, 4 e 8 células foi verificado (Tabela 9) e as estruturas foram transferidos para novas gotas do meio do CIV e incubadas para mais 96 horas (completar 168 horas após a fecundação), sem ou com a adição de 0,05 mM da MT, compondo-se quatro grupos: CMT<sub>0</sub><sup>168</sup>, CMT<sub>1</sub><sup>72</sup>, CMT<sub>1</sub><sup>96</sup> e CMT<sub>1</sub><sup>168</sup>.

Tabela 9- Efeito da metformina adicionada durante o cultivo no desenvolvimento embrionário para diferentes estruturas clivadas 72 horas após a fecundação

Grupo	ZP	2-células	4-células	8-células
CMT <sub>0</sub> <sup>168</sup>	93	5,48±1,04	18,95±7,65	41,49±13,2
CMT <sub>1</sub> <sup>72</sup>	91	6,94±2,56	20,96±7,48	35,59±5,46
CMT <sub>1</sub> <sup>96</sup>	116	4,47±1,67	24,61±6,76	27,85±9,27
CMT <sub>1</sub> <sup>168</sup>	91	9,13±1,97	17,05±3,89	32,72±7,45

\*ZP: o número de zigotos presumíveis, CMT<sub>0</sub> e CMT<sub>0</sub> e <sub>1</sub>: 0 e 0,05 mM da Metformina, <sup>72</sup>, <sup>96</sup> e <sup>168</sup>, horas após a fecundação. Os dados são expressos como Média±erro padrão da média (EPM).

As taxas de produção de embriões não apresentou diferença significativa entre os grupos (P>0,05) (Tabela 10).

Tabela 10- O desenvolvimento de embriões submetidos ao tratamento com a metformina nos primeiros três e últimos quatro dias do cultivo

*Grupo	ZP	Clivagem	BL total	Estágio de blastocisto				
				BL inicial	BL blastocisto	BL expandido	BL em eclosão	BL eclodido
CMT <sub>0</sub> <sup>168</sup>	93	65,9±4,8	25±3,85	3,39±1	9,23±3,44	11,09±4,12	0	1,3±1,13
CMT <sub>1</sub> <sup>72</sup>	91	63,47±6	28,17±6,45	3,4±1	10,95±3,49	12,6±3	0	1,19±1
CMT <sub>1</sub> <sup>96</sup>	116	56,9±5,36	20,69±1,77	4±2,19	3,5±2,1	11,32±1,47	0,66±0,59	1,17±1,05
CMT <sub>1</sub> <sup>168</sup>	91	58,9±8,96	22,56±4,32	4,4±2,24	3,58±1,8	13,58±2,98	0,96±0,83	0

\*ZP: o número de zigotos presumíveis, clivagem: verificada 72 horas após a fecundação, BL: blastocisto, CMT<sub>0</sub> e CMT<sub>0</sub> e <sub>1</sub>: 0 e 0,05 mM da Metformina, <sup>72</sup>, <sup>96</sup> e <sup>168</sup>: horas após a fecundação. Os dados são expressos como média±erro padrão da média (EPM).

A utilização da MT com (EXP3.1) ou sem (EXP3.2) renovação do meio otimizou a produção de embriões, porém variando de acordo com a concentração. Contudo, a viabilidade embrionária aferida pela taxa de apoptose foi reduzida na concentração de 0,1 mM MT na ausência da renovação do meio (EXP3.2). Outros antioxidantes dissolvíveis na água, não mostraram efeito no desenvolvimento de zigotos para blastocistos como a vitamina C (Sudano et al., 2018), o resveratol (Gaviria et al., 2019) e 2- mercaptoetanol no estudo dos Darwich et al. (2010), mas não dos Hosseini et al.

(2009) que relataram um avanço. O uso da GSH também apresentou resultados próximos do presente trabalho na produção, porém foram diferentes na qualidade de blastocistos (Sun et al., 2015; Li et al., 2019).

Neste experimento, a otimização na PIVE dependeu das doses da MT, e neste sentido a vitamina E apresentou efeitos entre o neutro (Olson e Seidel, 2000; Sudano et al., 2018) e o negativo no desenvolvimento embrionário (Feugang et al., 2004). Outrossim, consequências indesejáveis na produção de embriões resultaram com o acréscimo da cisteína-cisteamina juntas (Rocha-Frigoni et al., 2015), e do petrostilbeno (Sosa et al., 2020).

A ação da MT depende da concentração de glicose, sendo que na carência desse sacarídeo, a MT aumenta a incidência da morte programada nas células ovarianas malignas humanas (Má et al., 2019), isso provavelmente ocorreu nos embriões cultivados com MT, pois a glicose é ausente no meio de CIV utilizado no presente trabalho, e destaca-se a dose de 0,1 mM no EXP3.2, a qual no estudo dos Tosca et al. (2007) não modificou a integridade do *cumulus*.

Outro motivo de declínio da viabilidade embrionária é provavelmente a ativação da AMPK pela MT (Leclerc et al., 2013), mas 0,1 mM da MT não ativa a quinase (Tosca et al., 2007). Todavia isso pode ser questionado, em sentido de composição de meios e das estruturas tratadas, visto que a dose de  $2 \times 10^{-3}$  M MT no meio definitivo utilizado no trabalho dos Tosca et al. (2007) ativou a AMPK nos complexos *cumulus*-oócito, mas Bilodeau-Goeseels et al. (2011) afirmou ao contrário, usando meio semissintético. Por outro lado, Pikiou et al. (2015) detectaram elevação na quinase ativada em embriões bovinos cultivados no meio sem soro e tratados com  $10 \times 10^{-6}$  M da MT. Ainda, Stephenne et al. (2011) confirmaram experimentalmente em células hepáticas murinas e humanas que a MT atua inicialmente como antioxidante, e via essa ação ativa a AMPK em seguida, e isso foi afirmado por Kelly et al. (2015), o que é completamente oposto do conhecimento anterior (Hou et al., 2010).

No EXP3.3, o cultivo foi em duas partes, a primeira terminou quando a suposta terceira mitose estava completa (Grisart et al., 1994), e isso foi entre  $27,85 \pm 9,27\%$  e  $41,49 \pm 13,2\%$  dos embriões (Tabela 9), os quais evoluíram para blastocistos em proporções semelhantes entre os grupos.

Os estudos anteriores analisaram seus achados resultantes de tratamentos em uma parte de cultivo. Por exemplo, Ali et al. (2003) encontraram avanço quando os zigotos foram tratado com a cisteína, a catalase e o SOD, mas incluíram as mórulas

na produção final, e Fabra et al. (2023) reportaram o mesmo avanço com o ácido lipoico, o qual em um estudo anterior da mesma equipe (Fabra et al., 2020) demonstrou ao contrário no uso durante o período completo da pré-implantação. Zolini et al. (2019) chegaram ao resultado aproximado do presente trabalho na produção de embriões, acrescentando a carnitina nos mesmos intervalos aplicados no EXP3.3, e Takahashi et al. (1993) observaram um aumento no desenvolvimento quando os embriões no estágio de transição materno-embrionária foram cultivados com 2-mercaptoetanol, por outro lado o uso desse antioxidante pelo tempo inteiro de cultivo apresentou inconsistência nos resultados entre outros estudos (Hosseini et al., 2009; Darwich et al., 2010).

O efeito da metformina na produção de embriões apresentou dependência na dose e no protocolo seguido no cultivo, porém a adição da metformina em meio único (sem renovação) provocou um aumento na ocorrência da apoptose via mecanismos moleculares não identificados, os quais precisam de mais estudos.

#### 4.4. EXP4 (Metformina-Maturação e Cultivo)

Este experimento objetivou comparar os resultados da PIVE após a adição de 0,1 mM e 0,05 mM da MT nas etapas de maturação e do cultivo, bem como verificar o efeito desses tratamentos na ocupação e peroxidação lipídicas em blastocistos produzidos.

A diferença no desenvolvimento para embriões clivados ou com blastocelo não foi significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos. Porém, no  $MMT_0 + CMT_0$  menos zigotos evoluíram para BL inicial ( $P < 0,05$ ) do que no  $MMT_2 + CMT_0$  (Tabela 11).

Tabela 11- A produção de embriões de meios acrescentados de metformina

*Grupo	ZP	Clivagem	Blastocisto	Estágios de blastocistos				
				BL inicial	BL blastocisto	BL expandido	BL em eclosão	BL eclodido
(%)								
$MMT_0 + CMT_0$	151	$53,68 \pm 6,57$	$22,72 \pm 5,19$	$2,65 \pm 1,15^b$	$6,43 \pm 1,98$	$12,53 \pm 4,27$	0	$1,11 \pm 1,11$

MMT <sub>0</sub> +CMT <sub>1</sub>	143	58,26± 4,08	25,83±4,67	4,90±2,64 <sup>a,b</sup>	9,15±2,75	11,79±3 ,41	0	0
MMT <sub>2</sub> +CMT <sub>0</sub>	148	67,48± 4,41	30,06±7,31	11,65±5,24 <sup>a</sup>	6,05±2,72	9,80±3, 75	2,56± 1,2	0
MMT <sub>2</sub> +CMT <sub>1</sub>	127	57,24± 7,44	33,21±6,27	4,48±1,59 <sup>a,b</sup>	13,71±4,02	13,63±3 ,93	1,39± 1,39	0

\*ZP: número de zigotos presumíveis, MMT e CMT: metformina adicionada durante a maturação e o cultivo, MT<sub>0</sub>, MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>: controle, 0,05 e 0,1 mM da metformina, BL: blastocistos. Os dados são expressos em média±erro padrão da média (EPM), <sup>a, b</sup>: os sobrescritos diferentes na mesma coluna indicam um valor de P<0,05.

Após a coloração dos blastocistos com BODIPY<sup>581/591</sup>-C<sub>11</sub> (Figura 7), as áreas ocupadas por lipídios não diferenciaram significativamente entre os grupos (P>0,05). No MMT<sub>2</sub>+CMT<sub>1</sub>, a taxa dos lipídios oxidados foi menor (P<0,05) em comparação com MMT<sub>0</sub>+CMT<sub>0</sub> e MMT<sub>2</sub>+CMT<sub>0</sub>, e semelhante (P>0,05) do MMT<sub>0</sub>+CMT<sub>1</sub> (52,16±2,67%), sem diferença significativa (P>0,05) entre o controle, e MMT<sub>0</sub>+CMT<sub>1</sub> e MMT<sub>2</sub>+CMT<sub>0</sub> (Tabela 12).

Tabela 12- Efeito da metformina na distribuição e oxidação dos lipídios embrionários

*Grupo	BL corados	Lipídios/Embrião (Área)	Lipídios oxidados/Total (Florescência)
	(N)		(%)
MMT <sub>0</sub> +CMT <sub>0</sub>	26	27,22±3,9	55,99±1,92 <sup>a</sup>
MMT <sub>0</sub> +CMT <sub>1</sub>	18	19,65±1,84	52,16±2,67 <sup>a,b</sup>
MMT <sub>2</sub> +CMT <sub>0</sub>	33	24,21±2,19	57,47±2,35 <sup>a</sup>
MMT <sub>2</sub> +CMT <sub>1</sub>	23	20,19±2,94	48,75±2,76 <sup>b</sup>

\* BL: blastocistos, MMT e CMT: metformina adicionada nos meios da maturação e do cultivo, MT<sub>0</sub>, MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>: 0, 0,05 e 0,1 mM da metformina, N: número, os dados são apresentados em média±erro padrão da média (EPM), <sup>a, b</sup>: as letras diferentes na mesma coluna são de variáveis com diferença significativa entre si (P<0,05).

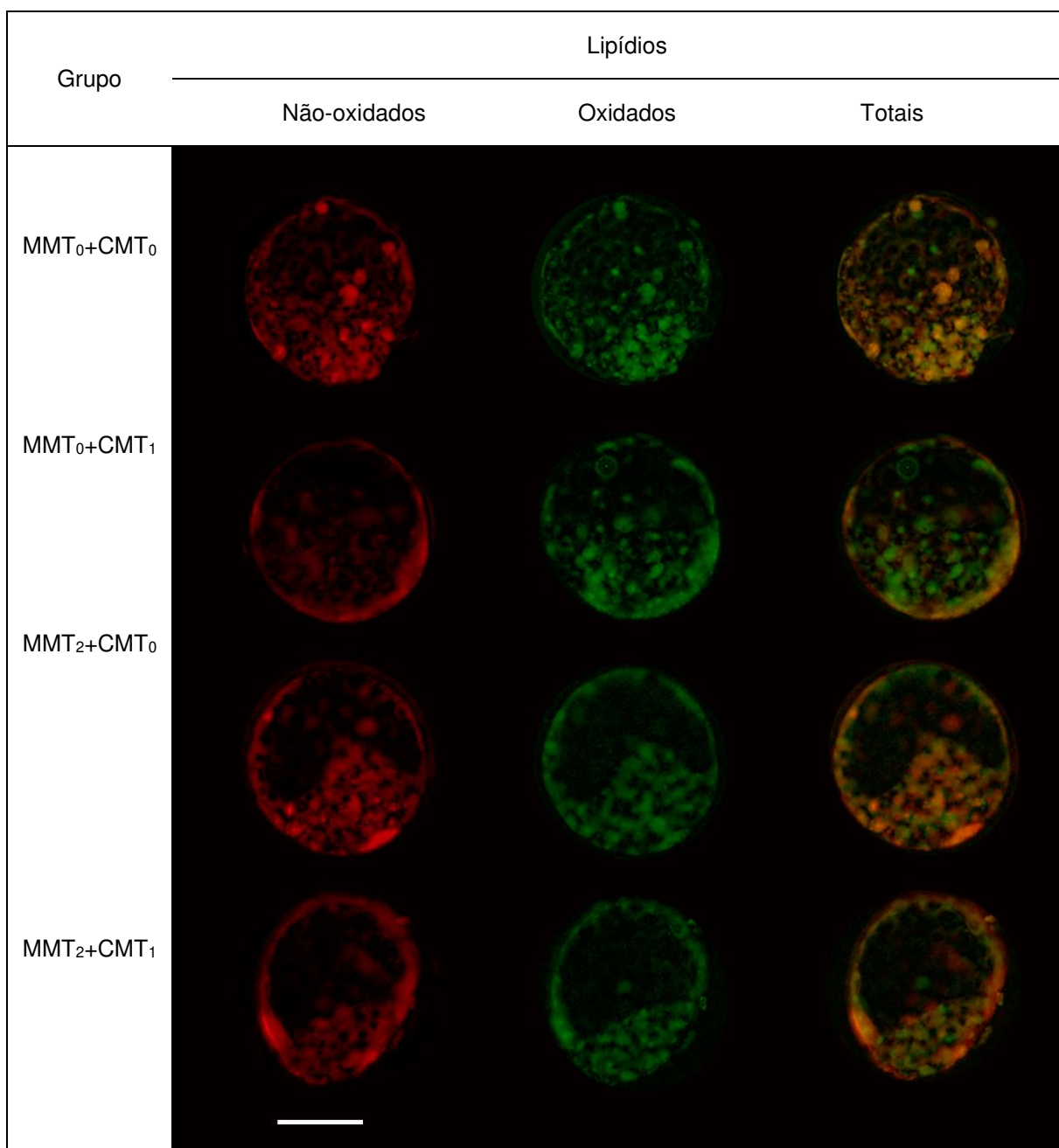


Figura 7- Área e oxidação lipídicas em embriões bovinos. Blastocistos corados com BODIPY<sup>581/591</sup>C<sub>11</sub> 168 horas após a fecundação, MMT e CMT: metformina acrescentada no meio da maturação e do cultivo, MT<sub>0</sub>, MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>: 0, 0,05 e 0,1 mM da metformina, a medida (linha branca) igual à 50 µm. Magnificação X20. EVOS M5000 microscope (Thermo Fischer, EUA).

Os resultados desse experimento mostraram que o desenvolvimento embrionário não mudou com o acréscimo de 0,1 mM e 0,05 mM da MT em uma etapa ou em combinação. Anteriormente, Pikiou et al. (2015) relatou uma parada precoce das divisões mitóticas em embriões bovinos, quando doses menores do que utilizadas no presente trabalho da metformina foram suplementadas no curso inteiro da produção.

No presente trabalho, o depósito lipídico embrionário bem como a os resultados da PIVE ficaram sem modificações relacionada à adição da MT, o que foi semelhante ao uso da cerulenina (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007a), da azida de sódio, da floretina (Torre-Sanchez et al., 2006b) e das associações da carnitina com o ácido linoleico (Dias et al., 2020) e ácido linoleico-forscolina (Oliveira et al., 2022). Por outro lado o dinitrofenol não diminuiu o acúmulo de lipídios e levou à consequência de reduzir a produção de embriões (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007a) e o mesmo encontrado no caso do ácido 9-12-octadecadienoico nos trabalhos de Darwich et al. (2010) e de Dias et al. (2020), porém Batista et al. (2014) detectaram uma redução nos lipídios embrionários no estágio pré-formação de blastocite e Lima et al. (2017) não encontraram resultados indesejáveis na produção de blastocistos.

A AMPK ativada é o mediador do papel da MT na diminuição da densidade de lipídios nas células somáticas (Zang et al., 2004; Alexandre et al., 2008); então no presente experimento, pode não haver ativação da quinase, possivelmente devido ao crescimento do SFB no meios da PIVE (Bilodeau-Goeseels et al., 2011; Pikiou et al., 2015) e por isso a área lipídica ficou inalterada em blastocistos produzidos dos grupos de tratamento, porém, mais estudos são necessários nesse sentido.

A marcação pela sonda BODIPY<sup>581/591</sup>-C<sub>11</sub> não somente identifica os lipídios totais, mas também os oxidados, os quais são a principal degradação provocada pelos radicais livres (Pap et al., 1999; Drummen et al., 2002; Su et al., 2019). O nível dessa lipoperoxidação foi diminuído em blastocistos produzidos de oócitos maturados e zigotos desenvolvidos na presença da MT, por meio de controlar uma fonte da liberação dos radicais livres (El-Mir et al., 2000; Owen et al., 2000; Wheaton et al., 2014), prevenindo a reação do excesso dos agentes oxidativos com os ácidos graxo (Pap et al., 1999) e com isso, o presente trabalho revelou uma provável relação da peroxidação entre o oócito e o embrião produzido, visto que a oxidação foi aproximada ( $P > 0,05$ ) entre o controle e os grupos tratados em uma etapa, e também entre MMT<sub>2</sub>+CMT<sub>1</sub> e MMT<sub>0</sub>+CMT<sub>1</sub>.

Independentemente do efeito da MT, observa-se no presente trabalho que os lipídios ocuparam quase um terço da área de blastocisto (MMT<sub>0</sub>+CMT<sub>0</sub>= 27,22±3,9%), sendo quase 60% oxidados (controle= 55,99±1,92%). Além disso, e para o melhor de nosso conhecimento, o presente trabalho é o primeiro que calculou a área de lipídios e a taxa da peroxidação em embriões bovinos, utilizando BODIPY<sup>581/591</sup>C<sub>11</sub>.

A metformina demonstrou ação antioxidante e aliviou a oxidação de lipídios

embrionários, especialmente quando suplementada antes e depois da co-incubação dos gametas, porém a sua função como reguladora de metabolismo precisa de investigação.

#### 4.5. EXP5 (Metformina-Criopreservação)

Neste experimento, foram observadas a recuperação e a habilidade de continuar o desenvolvimento após a vitrificação/aquecimento de blastocistos produzidos de oócitos e embriões tratados com MT.

Consistentemente com o resultado do experimento anterior, o desenvolvimento dos zigotos para embriões nas 48 e 168 horas após a fecundação não apresentou diferença significativa entre os grupos ( $P>0,05$ ) (Tabela 13).

Tabela 13- O desenvolvimento embrionário a partir de oócitos maturado e zigotos cultivados com metformina

*Grupo	ZP	Clivagem	BL Total	Estágios de Blastocisto			
				BL inicial	BL blastocisto	BL expandido	BL eclodido
MMT <sub>0</sub> +CMT <sub>0</sub>	450	65,25±5,27	37,33±2,33	3,98±1,28	3,56±0,88	23,45±1,96	6,33±1,98
MMT <sub>2</sub> +CMT <sub>1</sub>	411	58,33±4,63	37,99±3,41	4,39±1,52	6,16±1,39	23,32±2,23	4,11±1,23

\*ZP: o número dos zigotos presumíveis, BL: blastocisto, MMT e CMT: tratamento durante a maturação e o cultivo, MT<sub>0</sub>, MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>: 0, 0,05 e 0,1 mM da metformina, os resultados são expressos em média±erro padrão da média (EPM).

Os blastocistos de três repetições que não foram incluídos no processo da vitrificação [Eclodidos e blastocistos com aparência morfológica de degeneração (Bó e Mapletoft, 2018)], foram fixados e submetidos ao teste de viabilidade (Figura 8).

O número de blastômeros totais e apoptóticos, além da índice da apoptose foi semelhante ( $P>0,05$ ) entre os grupos (Tabela 14).

Tabela 14- Os blastômeros totais e apoptóticos em blastocistos produzidos de meios suplementados com metformina

*Grupo	BL	Blastômeros totais	Células apoptóticas	Taxa de apoptose
		N		(%)

MMT <sub>0</sub> +CMT <sub>0</sub>	23	211.39±13.95	65±7.1	32.33±3.46
MMT <sub>2</sub> +CMT <sub>1</sub>	14	215.92±22.7	64.92±8.55	31.77±3.15

\*MMT e CMT: metformina adicionada nos meios da maturação e do cultivo, MT<sub>0</sub>, MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>: controle, 0,05 e 0,1 mM da metformina, N: número, BL: blastocistos, os resultados são mencionados como média±erro padrão da média (EPM).

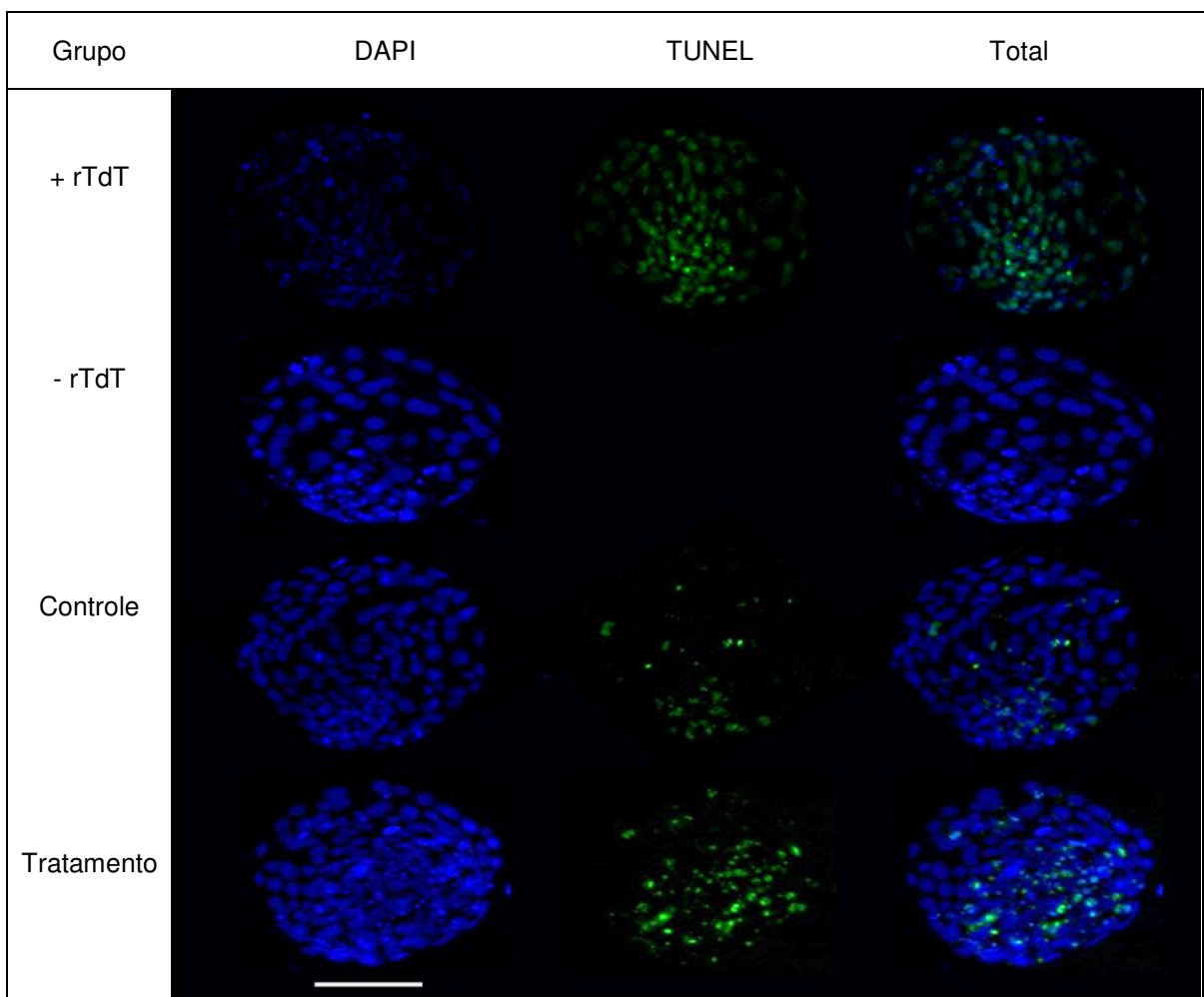


Figura 8- Blastocistos excluídos da vitrificação e corados com DAPI e TUNEL. Blastocistos eclodidos e embriões com células separadas das duas linhagens celulares embrionárias não foram submetidos à criopreservação e foram corados com DAPI (*4'6-diamidino-2-phenylindole*) e TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP- digoxigenin nick end-labeling*). + e - rTdT: embriões incubado ou não com enzima de *desoxinucleotidil-terminal transferase* para verificar o funcionamento do ensaio de TUNEL, Controle: grupo sem suplemento com metformina, Tratamento: 0,1 e 0,5 mM da metformina adicionados durante a maturação e o cultivo embrionário. Linha = 50 µm. Magnificação X20. (EVOS M5000 microscope; Thermo Fischer, EUA).

Após o aquecimento, a diferença na recuperação de blastocele, e na proporção de embriões eclodidos nas 4 e 48 horas foi semelhante ( $P>0,05$ ) entre MMT<sub>0</sub>+CMT<sub>0</sub> e

MMT<sub>2</sub>+CMT<sub>1</sub>. No entanto, os blastocistos no grupo de tratamento apresentaram uma taxa maior ( $P<0,05$ ) de eclosão nas 24 horas de reaquecimento em comparação com o controle (Tabela 15) (Figura 9).

Tabela 15- Efeito da presença da metformina durante a maturação e o cultivo na recuperação e na eclosão pós-vitrificação de blastocistos

Grupo	BL	Re-expansão (Horas)			Eclosão (Horas)	
		0	Para 24	4	24	48
MMT <sub>0</sub> +CMT <sub>0</sub>	96	12,75±1,65	96,73±1,57	6±2,44	6,54±1,58 <sup>b</sup>	15,95±3,94
MMT <sub>2</sub> +CMT <sub>1</sub>	106	16,31±1,88	95,39±2,66	2,67±1,21	15,93±9,33 <sup>a</sup>	28,13±10,56

\*MMT e CMT: metformina adicionada nos meios da maturação e do cultivo, MT<sub>0</sub>, MT<sub>1</sub> e MT<sub>2</sub>: controle, 0,05 e 0,1 mM da metformina, N: número, BL: blastocistos aquecidos, Para 24: a re-expansão foi verificada nas primeira, quarta e vigésima-quarta hora de reaquecimento, sendo idêntica nesse horários, os resultados são expressos em média%±erro padrão da média (EPM), <sup>a, b</sup>: os sobrescritos diferentes na mesma coluna indicam um valor de  $P<0,05$ .

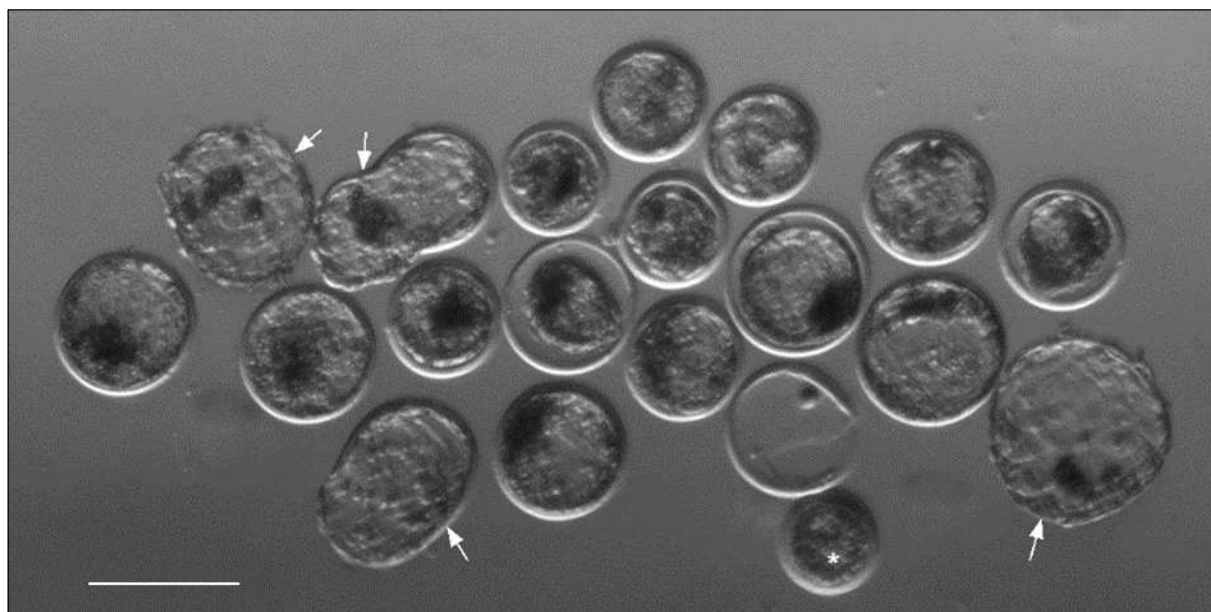


Figura 9- O desenvolvimento embrionário pós-criopreservação. A eclosão de blastocistos (setas) cultivados por 48 horas após o aquecimento, o resto dos embriões na imagem recuperou-se, menos o marcado com \*. A linha branca= 100 µm no aumento X20.

A apoptose que é um tipo mais estudado da morte celular programada em embriões, ocorre com frequência maior na linha celular pluripotente em comparação

com o trofoblasto, sendo um mecanismo importante para eliminar os blastômeros com defeitos nos cromossomos (Gjorret et al., 2003; 2007; Leidenfrost et al., 2011; Ramos-Ibeas et al., 2020), mas a questão do limite necessário desse processo, além da existência de outras vias da morte celular precisam de mais estudos.

Neste experimento, a MT não demonstrou efeito no número de blastômeros ou a viabilidade embrionária; entretanto, os blastocistos produzidos nos grupos de tratamento nos EXP2 e EXP3.2 apresentaram uma porcentagem aumentada de apoptose, e isso ressalta a ação colaboradora da MT na maturação e no cultivo, observada previamente na peroxidação de lipídios. Também supostamente, a morte celular programada pode ser correlacionada, mesmo parcialmente com os lipídios oxidados.

Sudano et al. (2011) afirmaram que a sobrevivência após o aquecimento depende na ocorrência de apoptose em blastocistos antes da vitrificação, porém no presente trabalho a viabilidade embrionária (Tabela 14) e a recuperação pós-reaquecimento (Tabela 15) foram aproximadas entre os grupos.

Mas baseando-se na peroxidação lipídica atenuada pela MT (EXP4), o avanço em desenvolvimento pós-criopreservação adquirido no grupo  $MMT_2+CMT_1$ , pode ser relacionado à menor oxidação dos lipídios.

O restabelecimento do blastocele é um indicador de sucesso da vitrificação (Valente et al., 2020), o qual apresentou uma média relativamente alta no presente trabalho (controle= 96,73%), do que outras revisadas em outras publicações (70-93%, média= 75%) (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007b; Hosseini et al., 2009; Darwich et al., 2010; Sudano et al., 2011; Sanches et al., 2013; Paschoal et al., 2014; 2017; Held-Hoelker et al., 2017; Gaviria et al., 2019; Marques et al., 2021; Ghanem et al., 2022; Oliveira et al., 2022; Fabra et al., 2023).

Essa taxa superior da recuperação manteve no blastocistos tratados com MT. Em modo geral, os moduladores de metabolismo ou os antioxidantes não apresentam modificação detectada na re-expansão pós-vitrificação, como no uso de PES (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007b; Sudano et al., 2011), 2-mercaptoetanol (Hosseini et al., 2009; Darwich et al., 2010), forscolina (Paschoal et al., 2014; 2017; Sanches et al., 2013), resveratrol (Gaviria et al., 2019), mistura de reagentes lipolíticos (Oliveira et al., 2022) e ácido lipóico (Fabra et al., 2023), com exceção de ácido linoleico que reduziu recuperação no estudo de Darwich et al. (2010) e melhorou o mesmo em outro trabalho (Lima et al., 2017).

A eclosão do blastocisto é uma condição essencial da gestação (Negron-Perez e Hansen, 2017), e esse critério importante foi antecipado pela metformina após o reaquecimento. Essa capacidade de romper a zona pelúcida pelos embriões recuperados foi diminuída, independentemente da otimização da produção de embriões com a utilização de 2-mercaptoetanol (Hosseini et al., 2009) e o ácido lipoico (Fabra et al., 2023), e não foi avançada, não obstante a modificação de acúmulo de lipídios pelo cultivo embrionário com PES (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007b), forscolina (Sanches et al., 2013) ou carnitina-forscolina-ácido linoleico (Oliveira et al., 2022).

Da mesma forma da MT em atender as demandas na criotolerância otimizada, foram a melatonina (Marques et al., 2021), a carnitina (Held-Hoelker et al., 2017; Ghanem et al., 2022) e o ácido linoleico (Lima et al., 2017). Contudo a facilidade de manipular a metformina (solução aquosa) (Zaidan et al., 2017; Lange et al., 2021) favorece o seu uso na PIVE às aquelas substâncias dissolvíveis somente em solventes orgânicos (Marques et al., 2021; Oliveira et al., 2022; Ghanem et al., 2022).

Destaca-se, que a densidade de lipídios em blastocistos frescos não é uma medida apropriada para a reconstituição prevista de blastocite pós-criopreservação (Sudano et al., 2011), e isso também combina com a capacidade de desenvolver após o reaquecimento, uma vez que o depósito lipídico no presente trabalho (EXP4) não mostrou interferência na eclosão pós-vitrificação (EXP5); adicionalmente, em estudos anteriores, a diminuição do acúmulo de lipídios não refletiu na criotolerância (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007b; Sanches et al., 2013; Paschoal et al., 2017). No entanto, a recuperação depende de tipo de lipídio (Banliat et al., 2019) enquanto a eclosão pós-vitrificação como foi encontrado no presente trabalho segue o estágio da peroxidação lipídica.

A metformina otimizou a produção de embriões em direção a blastocistos crio-resistíveis e capazes de evoluir após a vitrificação.

## 5. CONCLUSÕES

A metformina apresentou efeito dose, protocolo e etapa dependentes na produção *in vitro* de embriões e aprimorou a criotolerância de blastocistos promovendo uma proteção dos lipídios celulares contra a peroxidação. Porém, os mecanismos

moleculares da sua ação precisam de mais estudos, especialmente a ativação de quinase ativada por monofosfato de adenosina em embriões bovinos.

O presente trabalho revelou que a habilidade de desenvolvimento de um blastocisto vitrificado/reaquecido pode estar associada aos lipídios oxidados.

A metformina pode ser útil como um aditivo nos meios da maturação e o cultivo embrionário para fins de melhorar sobrevivência pós vitrificação.

## REFERÊNCIAS

- AARDEMA, H.; TOL, V. H. T. A.; WUBBOLTS, R. W.; BROUWERS, J. F. H. M.; GADELLA, B. M.; ROELEN, B. A. J. Stearoyl-CoA desaturase activity in bovine cumulus cells protects the oocyte against saturated fatty acid stress. **Biology of Reproduction**, v. 96, n. 5, p. 982–992, May. 2017.
- ABOELAIN, M.; EL DOMANY, W. B.; ELDOUMANI, H.; KHALIL, W. A. Antioxidant response element activator, BTZO-1, improves the developmental competence of bovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 8, p. 1021–1024, Aug. 2020.
- ADONA, P. R.; PIRES, P. R. L.; TGLAS, M. D.; SCHWARZ, K. R. L.; LEAL, C. L. V. 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, Oct. 2008.
- AGUIAR, L. H.; HYDE, K. A.; PEDROZA, G. H.; DENICOL, A. C. Heat stress impairs in vitro development of pre-antral follicles of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 213, p. 106277, Feb. 2020.
- AKTAS, H.; WHEELER, M. B.; ROSENKRANS, C. F.; FIRST, N. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. Maintenance of bovine oocytes in prophase of meiosis I by high [cAMP]<sub>i</sub>. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 105, n. 2, p. 227–235, Nov. 1995.
- ALEXANDRE, K. B.; SMIT, A. M.; GRAY, I. P.; CROWTHER, N. J. Metformin inhibits intracellular lipid accumulation in the murine pre-adipocyte cell line, 3T3-L1. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 10, n. 8, p. 688-690, Aug. 2008.
- ALI, A. A.; BILODEAU, J. F.; SIRARD, M. A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v. 59, n. 3-4, p. 939-949, Aug. 2003.
- AL-ZAIDAN, L.; EL-RUZ, R. A.; MALKI, A. M. Screening Novel Molecular Targets of Metformin in Breast Cancer by Proteomic Approach. **Frontiers in Public Health**, v. 5, n. 277, p. 1-22, Oct. 2017.
- AMIN, A.; GAD, A.; SALILEW-WONDIM, D.; PRASTOWO, S.; HELD, E.; HOELKER, M.; RINGS, F.; THOLEN, E.; NEUHOFF, C.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K.;

TESFAYE, D. Bovine embryo survival under oxidative-stress conditions is associated with activity of the NRF2-mediated oxidative-stress-response pathway. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 6, p. 497–513, Jun. 2014.

ANNES, K.; MÜLLER, D. B.; VILELA, J. A. P.; VALENTE, R. S.; CAETANO, D. P.; CIBIN, F. W. S.; MILAZZOTTO, M. P.; MESQUITA, F. S.; BELAZ, K. R. A.; EBERLIN, M. N.; SUDANO, M. J. Influence of follicle size on bovine oocyte lipid composition, follicular metabolic and stress markers, embryo development and blastocyst lipid content. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 31, n. 3, p. 462–472, Mar. 2019.

ARMSTRONG, D. G.; BAXTER, G.; HOGG, C. O.; WOAD, K. J. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. **Reproduction**, v. 123, n. 6, p. 789–797, Jun. 2002.

AUGUSTIN, R.; POCAR, P.; NAVARRETE-SANTOS, A.; WRENZYCKI, C.; GANDOLFI, F.; NIEMANN, H.; FISCHER, B. Glucose transporter expression is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, n. 3, p. 370–376, Nov. 2001.

AUGUSTYNIAK, A.; BARTOSZ, G.; CIPAK, A.; DUBURS, G.; HORÁKOVÁ, L.; LUCZAJ, W.; MAJEKOVA, M.; ODYSSEOS, A.D.; RACKOVA, L.; SKRZYDLEWSKA, E.; STEFEK, M.; STROSOVÁ, M.; TIRZITIS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VISKUPICOVA, J.; VRAKA, P. S.; ZARKOVIĆ, N. Natural and synthetic antioxidants: an updated overview. **Free Radical Research**, v. 44, n. 10, p. 1216–1262, Oct. 2010.

AZZI, A.; DAVIES, K. J.; KELLY, F. Free radical biology - terminology and critical thinking. **FEBS Letters**, v. 558, n. 1-3, p. 3-6, Jan. 2004.

BANLIAT, C.; DUBUISSON, F.; CORBIN, E.; BEUROIS, J.; TOMAS, D.; LEBOURHIS, D.; SALVETTI, P.; LABAS, V.; MERMILLOD, P.; SAINT-DIZIER, M. Intraoviductal concentrations of steroid hormones during in vitro culture changed phospholipid profiles and cryotolerance of bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 86, n. 6, p. 661–672, Jun. 2019.

BATISTA, R. I.; RAPOSO, N. R.; CAMPOS-JUNIOR, P. H.; PEREIRA, M. M.; CAMARGO, L. S.; CARVALHO, B. C.; GAMA, M. A.; VIANA, J. H. Trans-10, cis-12

conjugated linoleic acid reduces neutral lipid content and may affect cryotolerance of in vitro-produced crossbred bovine embryos. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 33, Jun. 2014.

aBARCELO-FIMBRES, M.; SEIDEL, G. E. Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 11, p. 1406–1418, Nov. 2007.

bBARCELO-FIMBRES, M.; SEIDEL, G. E. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 11, p. 1395–1405, Nov. 2007.

BENSAAD, K.; FAVARO, E.; LEWIS, C. A.; PECK, B.; LORD, S.; COLLINS, J. M.; PINNICK, K. E.; WIGFIELD, S.; BUFFA, F. M.; LI, J. L.; ZHANG, Q.; WAKELAM, M. J. O.; KARPE, F.; SCHULZE, A.; HARRIS, A. L. Fatty acid uptake and lipid storage induced by HIF-1 $\alpha$  contribute to cell growth and survival after hypoxia-reoxygenation. **Cell Reports**, v. 9, n. 1, p. 349–365, Oct. 2014.

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, Aug. 2012.

BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P. L.; KASTELIC, J. P. Activation of AMP-activated protein kinase may not be involved in AICAR- and metformin-mediated meiotic arrest in bovine denuded and cumulus-enclosed oocytes in vitro. **Zygote**, v. 19, n. 2, p. 97–106, May. 2011.

BILODEAU-GOESEELS, S.; SASSEVILLE, M.; GUILLEMETTE, C.; RICHARD, F. J. Effects of adenosine monophosphate-activated kinase activators on bovine oocyte nuclear maturation in vitro. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 74, n. 8, p. 1021-1034, Aug. 2007.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5,

n. 1, p. 9-19, Jan. 2012.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L. A.; SIRARD, M. A. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, v. 47, n. 5, p. 1061–1075, Apr. 1997.

BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Evaluation and classification of bovine embryos. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 344-348, Jul./Sep. 2018.

BONI, R.; TOSTI, E.; ROVIELLO, S.; DALE, B. Intercellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 4, p. 1050–1055, Oct. 1999.

BOONSTRA, J.; POST, J. A. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. **Gene**, v. 4, n. 337, p. 1–13, Aug. 2004.

BYRNE, A. T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D. R.; LEESE, H. J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, n. 1, p. 97–105, Feb. 1999.

CAMARGO, L. S.; COSTA, F. Q.; MUNK, M.; WOHLRES-VIANA, S.; SERAPIÃO, R. V.; CARVALHO, B. C.; CAMPOS, J. P. H.; VIEIRA, A. C.; NOGUEIRA, L. A.; VIANA, J. H. Contrasting effects of heat shock during in vitro maturation on development of in vitro-fertilized and parthenogenetic bovine embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 10, p. 1357-1365, Oct. 2019.

CETICA, P. D.; PINTOS, L. N. ; DALVIT, G. C.; BECONI, M. T. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte in vitro maturation. **IUBMB LIFE**, v. 51, n. 1, p. 57-64, Jan. 2001.

CETICA, P.; PINTOS, L.; DALVIT, G.; BECONI, M. T. Involvement of enzymes of amino acid metabolism and tricarboxylic acid cycle in bovine oocyte maturation in vitro. **Reproduction**, v. 126, n. 6, p. 753–763, Dec. 2003.

CHANKITISAKUL, V.; SOMFAI, T.; INABA, Y.; TECHAKUMPHU, M.; NAGAI, T. Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine in vitro matured oocytes. **Theriogenology**, v. 79, n. 4, p. 590–598, Mar. 2013.

CHOWDHURY, M. M. R.; CHOI, B. H.; KHAN, I.; LEE, K. L.; MESALAM, A.; SONG, S. H.; XU, L.; JOO, M. D.; AFRIN, F.; KONG, I. K. Supplementation of lycopene in maturation media improves bovine embryo quality in vitro. **Theriogenology**, v. 103, p. 173–184, Nov. 2017.

CONTI, M.; FRANCIOSI, F. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events. **Human reproduction update**, v. 24, n. 3, p. 245–266, May. 2018.

CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J. Y.; SU, Y. Q. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 4, p. 715–723, Apr. 2006.

CURNOW, E. C.; RYAN, J. P.; SAUNDERS, D. M.; HAYES, E. S. Developmental potential of bovine oocytes following IVM in the presence of glutathione ethyl ester. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 22, n. 4, p. 597–605, Sept. 2010.

DALVIT, G.; LLANES, S. P.; DESCALZO, A.; INSANI, M.; BECONI, M.; CETICA, P. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte in vitro maturation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, n. 2, p. 93–97, Apr. 2005.

DARWICH, A.; PERREAU, C.; PETIT, M. H.; PAPILLIER, P.; DUPONT, J.; GUILLAUME, D.; MERMILLOD, P.; GUIGNOT, F. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPKalpha phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 93, n. 1-2, p. 30–36, Sep. 2010.

DAVOODIAN, N.; KADIVAR, A.; DAVOODIAN, N.; AHMADI, E.; NAZARI, H.; MEHRBAN, H. The effect of quercetin in the maturation media on cumulus-granulosa cells and the developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 189, p. 262–269, Sept. 2022.

DAVOODIAN, N.; KADIVAR, A.; MEHRBAN, H. Supplementation of media with gamma-oryzanol as a novel antioxidant to overcome redox imbalance during bovine oocyte maturation in vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 59, n. 1, p. e14503, Jan. 2024.

DIAS, L. R. O.; LEME, L. O.; SPRÍCIGO, J. F. W.; PIVATO, I.; DODE, M. A. N. Effect

of delipidant agents during in vitro culture on the development, lipid content, gene expression and cryotolerance of bovine embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 1, p. 11–20, Jan. 2020.

DOLOWY, M.; JAMPILEK, J.; BOBER-MAJNUSZ, K. A Comparative Study of the Lipophilicity of Metformin and Phenformin. **Molecules**, v. 26, n. 21, p. 6613, Oct. 2021.

DRUMMEN, G. P.; LIEBERGEN, V. L. C.; KAMP, O. J. A.; POST, J. A. C11-BODIPY(581/591), an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 4, p. 473–490, Aug. 2002.

DUNNING, K. R.; RUSSELL, D. L.; ROBKER, R. L. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and  $\beta$ -oxidation. **Reproduction**, v. 148, n. 1, R15–R27, Jul. 2014.

EDWARDS, M.; MOHIUDDIN S. S. **Biochemistry, Lipolysis**. Treasure Island: Florida StatPearls Publishing, 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560564/>>. Acesso em: 27 jul. 2023.

EL-MIR, M. Y.; NOGUEIRA, V.; FONTAINE, E.; AVERET, N.; RIGOULET, M.; LEVERVE, X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 1, p. 223-228, Jan. 2000.

EL-SHEIKH, M.; MESALAM, A. A.; IDREES, M.; SIDRAT, T.; MESALAM, A.; LEE, K. L.; KONG, I. K. Nicotinamide supplementation during the in vitro maturation of oocytes improves the developmental competence of preimplantation embryos: potential link to SIRT1/AKT signaling. **Cells**, v. 9, n. 6, p. 1550, Jun. 2020.

EPPIG, J. J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F. L. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 99, n. 5, p. 2890-2894, Mar. 2002.

FABRA, M. C.; ANCHORDOQUY, J. P.; CARRANZA-MARTÍN, A. C.; FARNETANO, N.; ANCHORDOQUY, J. M.; FURNUS, C. C.; NIKOLOFF, N. Alpha-lipoic acid improves bovine preimplantation blastocyst quality and cryotolerance.

**Theriogenology**, v. 198, p. 61–68, Mar. 2023.

FABRA, M. C.; IZQUIERDO, I.; ANCHORDOQUY, J. M.; ANCHORDOQUY, J. P.; CARRANZA-MARTÍN, A. C.; NIKOLOFF, N.; FURNUS, C. C. Effect of alpha-lipoic acid during preimplantation development of cattle embryos when there were different in vitro culture conditions. **Animal Reproduction Science**, v. 221, p. 106550, Oct. 2020.

FAIR, T.; HULSHOF, S. C.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and Embryology**, v. 195, n. 4, p. 327-336, Apr. 1997.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; MOTLIK, J.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes in vitro using butyrolactone I: effects on oocyte ultrastructure and nucleolus function. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, n. 3, p. 375–386, Jul. 2002.

FARIA, O. A. C.; KAWAMOTO, T. S.; DIAS, L. R. O.; FIDELIS, A. A. G.; LEME, L. O.; CAIXETA, F. M. C.; GOMES, A. C. M. M.; SPRÍCIGO, J. F. W.; DODE, M. A. N. Maturation system affects lipid accumulation in bovine oocytes. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 33, n. 5, p. 372–380, Mar. 2021.

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

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

FEUGANG, J. M.; ROOVER, R.; MOENS, A.; LÉONARD, S.; DESSY, F.; DONNAY, I. Addition of beta-mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. **Theriogenology**, v. 61, n. 1, p. 71–90, Jan. 2004.

FISCHER, Y.; THOMAS, J.; RÖSEN, P.; KAMMERMEIER, H. Action of metformin on glucose transport and glucose transporter GLUT1 and GLUT4 in heart muscle cells from healthy and diabetic rats. **Endocrinology**, v. 136, n. 2, p. 412–420, Feb. 1995.

FISSORE, R. A.; HE, C. L.; WOUDE, V. G. F. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1261–1270, Dec. 1996.

GAD, A.; HOELKER, M.; BESENFELDER, U.; HAVLICEK, V.; CINAR, U.; RINGS, F.; HELD, E.; DUFORT, I.; SIRARD, M. A.; SCHELLANDER, K.; ESFAYE, D. Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative in vivo and in vitro culture conditions. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 4, p. 1-13, Oct. 2012.

GALANO, A.; ALVAREZ-IDABOY, J. R. Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals. **Rsc Advances**, v. 1, n. 9, p. 1763-1771, Dez. 2011.

GANDOLFI, F.; MILANESI, E.; POCAR, P.; LUCIANO, A. M.; BREVINI, T. A.; ACOCELLA, F.; LAURIA, A.; ARMSTRONG, D. T. Comparative analysis of calf and cow oocytes during in vitro maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 49, n. 2, p. 168–175, Feb. 1998.

GAVIRIA, M. S.; MORADO, S. A.; HERRERA, L. A.; BETANCUR, R. G.; ÁLVAREZ, U. R. A.; ZULUAGA, E. E. J.; CÉTICA, P. D. Resveratrol supplementation promotes recovery of lower oxidative metabolism after vitrification and warming of in vitro-produced bovine embryos. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 31, n. 3, p. 521-528, Mar. 2019.

GESHI, M.; TAKENOUCI, N.; YAMAUCHI, N.; NAGAI, T. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 6, p. 1730–1734, Dec. 2000.

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

GJORRET, J. O.; KNIJN, H. M.; DIELEMAN, S. J.; AVERY, B.; LARSSON, L. I.; MADDOX-HYTTEL, P. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo

and in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 4, p. 1193–1200, Oct. 2003.

GJORRET, J. O.; FABIAN, D.; AVERY, B.; MADDOX-HYTTEL, P. Active caspase-3 and ultrastructural evidence of apoptosis in spontaneous and induced cell death in bovine in vitro produced pre-implantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 8, p. 961–971, Aug. 2007.

GÓMEZ, E.; CARROCERA, S.; MARTÍN, D.; PÉREZ-JÁNEZ, J. J.; PRENDES, J.; PRENDES, J. M.; VÁZQUEZ, A.; MURILLO, A.; GIMENO, I.; MUÑOZ, M. Efficient one-step direct transfer to recipients of thawed bovine embryos cultured in vitro and frozen in chemically defined medium. **Theriogenology**, v. 146, p. 39–47, Apr. 2020.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, N.; MARTÍNEZ-RODERO, I.; SCHERZER, J.; JUNG, S.; REICHENBACH, M.; ZABLOTSKI, Y.; OTZDORFF, C.; ZERBE, H.; MOGAS, T. Vitrification and in-straw warming do not affect pregnancy rates of biopsied bovine embryos. **Theriogenology**, v. 191, p. 221–230, Oct. 2022.

GOPICHANDRAN, N.; LEESE, H. J. Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid. **Reproduction**, v. 126, n. 3, p. 299–308, Sep. 2003.

GRISART, B.; MASSIP, A.; DESSY, F. Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, n. 2, p. 257–264, Jul. 1994.

GUEMRA, S.; SANTO, S. E.; ZANIN, R.; MONZANI, P. S.; SOVERNIGO, T. C.; OHASHI, O. M.; VERDE LEAL, V. C. L.; ADONA, P. R. Effect of temporary meiosis block during prematuration of bovine cumulus-oocyte complexes on pregnancy rates in a commercial setting for in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 81, n. 7, p. 982–987, Apr. 2014.

GUO, X.; LI, H.; XU, H.; WOO, S.; DONG, H.; LU, F.; LANGE, A.J.; WU, C. Glycolysis in the control of blood glucose homeostasis. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 2, p. 358-367, Aug. 2012.

GUPTA, S.; CHOI, A.; YU, H. Y.; CZERNIAK, S. M.; HOLICK, E. A.; PAOLELLA, L. J.; AGARWAL, A.; COMBELLES, C. M. Fluctuations in total antioxidant capacity,

catalase activity and hydrogen peroxide levels of follicular fluid during bovine folliculogenesis. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 23, n. 5, p. 673–680, Oct. 2011.

HARDY, M. L. M.; DAY, M. L.; MORRIS, M. B. Redox Regulation and Oxidative Stress in Mammalian Oocytes and Embryos Developed In Vivo and In Vitro. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 21, p. 11374, Oct. 2021.

HASLER, J. F.; HENDERSON, W. B.; HURTGEN, P. J.; JIN, Z. Q.; MCCAULEY, A. D.; MOWER, S. A.; NEELY, B.; SHUEY, L. S.; STOCKES, J. E.; TRIMMER, S. A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 141-152, Jan. 1995.

HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; TAKAKURA, R.; IMAI, H. Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 6, p. 1696–1701, Jun. 2002.

HARVEY, A. J.; KIND, K. L.; PANTALEON, M.; ARMSTRONG, D. T.; THOMPSON, J. G. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 4, p. 1108–1119, Oct. 2004.

HELD-HOELKER, E.; KLEIN, S. L.; RINGS, F.; SALILEW-WONDIM, D.; SAEED-ZIDANE, M.; NEUHOFF, C.; TESFAYE, D.; SCHELLANDER, K.; HOELKER, M. Cryosurvival of in vitro produced bovine embryos supplemented with l-Carnitine and concurrent reduction of fatty acids. **Theriogenology**, v. 96, p. 145–152, Jul. 2017.

HONG, S. G.; JANG, G.; OH, H. J.; KOO, O. J.; PARK, J. E.; PARK, H. J.; KANG, S. K.; LEE, B. C. The effects of brain-derived neurotrophic factor and metformin on in vitro developmental competence of bovine oocytes. **Zygote**, v. 17, n. 3, p. 187-193, Aug. 2009.

HOSSEINI, S. M.; FOROUZANFAR, M.; HAJIAN, M.; ASGARI, V.; ABEDI, P.; HOSSEINI, L.; OSTADHOSSEINI, S.; MOULAVI, F.; LANGRROODI, S. M.; SADEGHI, H.; BAHRAMIAN, H.; EGHBALESAIED, S. H.; NASR-ESFAHANI, M. H. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important?. **Journal of Assisted**

**Reproduction and Genetics**, v. 26, n. 6, p. 355–364, Jun. 2009.

HOU, X.; SONG, J.; LI, X. N.; ZHANG, L.; WANG, X.; CHEN, L.; SHEN, Y. H. Metformin reduces intracellular reactive oxygen species levels by upregulating expression of the antioxidant thioredoxin via the AMPK-FOXO3 pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, n. 2, p. 199–205, May. 2010.

HUANG, Z.; PANG, Y.; HAO, H.; DU, W.; ZHAO, X.; ZHU, H. Effects of epigallocatechin-3-gallate on bovine oocytes matured in vitro. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 31, n. 9, p. 1420–1430, Sept. 2018.

HUNDAL, H. S.; RAMLAL, T.; REYES, R.; LEITER, L. A.; KLIP, A. Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells. **Endocrinology**, v. 131, n. 3, p. 1165–1173, Sept. 1992.

IDRISSI, J. S.; SLEZEC-FRICK, V.; BOURHIS, D.; BERRE, L.; JOLY, T.; BUFF, S.; DESMARCHAIS, A.; SCHIBLER, L.; SALVETTI, P.; ELIS, S. Effect of DHA on the quality of In vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 187, p. 102–111, Jul. 2022.

IMAI, K.; KOBAYASHI, S.; KANEYAMA, K.; KOJIMA, T.; NAGAI, T. Effects of butyrolactone-I on GVBD in bovine oocytes and subsequent maturation, fertilization and development in vitro. **Journal of Reproduction and Development**, v. 48, n. 3, p. 249-255, Jan. 2002.

JEON, Y. G.; KIM, Y. Y.; LEE, G.; KIM, J. B. Physiological and pathological roles of lipogenesis. **Nature metabolism**, v. 5, n. 5, p. 735–759, May. 2023.

JIAO, A.; SUN, J.; SUN, Z.; ZHAO, Y.; HAN, T.; ZHANG, H.; GAO, Q. Effects of limonin on oxidative stress and early apoptosis in oocytes during in vitro maturation. **Theriogenology**, v. 218, p. 8-15, Jan. 2024.

KAJDASZ, A.; WARZYCH, E.; DEREBECKA, N. ; MADEJA, Z. E.; LECHNIAK, D.; WESOLY, J.; PAWLAK, P. Lipid stores and lipid metabolism associated gene expression in porcine and bovine parthenogenetic embryos revealed by fluorescent staining and RNA-seq. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 6488, Sep. 2020.

KAMENETSKY, M.; MIDDELHAUFE, S.; BANK, E. M.; LEVIN, L. R.; BUCK, J.; STEEGBORN, C. Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. **Journal of Molecular Biology**, v. 362, n. 4, p. 623–639, Sep. 2006.

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**, v. 14, n. 2, p. 330, Jan. 2024.

KELLY, B.; TANNAHILL, G. M.; MURPHY, M. P.; O'NEILL, L. A. Metformin Inhibits the Production of Reactive Oxygen Species from NADH:Ubiquinone Oxidoreductase to Limit Induction of Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and Boosts Interleukin-10 (IL-10) in Lipopolysaccharide (LPS)-activated Macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 33, p. 20348–20359, Aug. 2015.

KERSTEN, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. **EMBO reports**, v. 2, n. 4, p. 282–286, Apr. 2001.

KHAN, I.; KIM, S. W.; LEE, K. L.; SONG, S. H.; MESALAM, A.; CHOWDHURY, M.; UDDIN, Z.; PARK, K. H.; KONG, I. K. Polydatin improves the developmental competence of bovine embryos in vitro via induction of sirtuin 1 (Sirt1). **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 29, n. 10, p. 2011–2020, Sept. 2017.

KANE, D.A. Lactate oxidation at the mitochondria: a lactate-malate-aspartate shuttle at work. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, n. 366, p.1-6, Nov. 2014.

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

KIM, J. Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. **Reproduction**, v. 122, n. 1, p. 131–138, Jul. 2001.

KNIJN, H. M.; WRENZYCKI, C.; HENDRIKSEN, P. J.; VOS, P. L.; HERRMANN, D.; WEIJDEN, V. G. C.; NIEMANN, H.; DIELEMAN, S. J. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo. **Reproduction**, v. 124, n. 3, p. 365–375, Sep. 2002.

KOUNDOUROS, N.; POULOGIANNIS, G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. **British Journal of Cancer**, v. 122, n. 1, p. 4–22, Jan. 2020.

KOWALTOWSKI, A. J.; SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERGESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 333-343, Aug. 2009.

KOTSUJI, F.; KUBO, M.; TOMINAGA, T. Effect of interactions between granulosa and thecal cells on meiotic arrest in bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, n. 1, p. 151-156, Jan. 1994.

KOYAMA, K.; KANG, S. S.; HUANG, W.; YANAGAWA, Y.; TAKAHASHI, Y.; NAGANO, M. Estimation of the optimal timing of fertilization for embryo development of in vitro-matured bovine oocytes based on the times of nuclear maturation and sperm penetration. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 76, n. 5, p. 653–659, May. 2014.

KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; SCHULTZ, R. M.; PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 2, p. 292–302, Feb. 2000.

KURZELLA, J.; MISKEL, D.; RINGS, F.; THOLEN, E.; TESFAYE, D.; SCHELLANDER, K.; SALILEW-WONDIM, D.; HELD-HOELKER, E.; BRINKHAUS, G. C.; HOELKER, M. 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, p. 19408, Nov. 2023.

LANGE, C.; WEBER, M. A.; SCHMIDT, R.; SCHROEDER, C.; STROWITZKI, T.; GERMEYER, A. Changes in protein expression due to metformin treatment and hyperinsulinemia in a human endometrial cancer cell line. **PloS One**, v. 16, n. 3, p. e0248103, Mar. 2021.

LECLERC, G. M.; LECLERC, G. J.; KUZNETSOV, J. N.; DESALVO, J.; BARREDO, J. C. Metformin induces apoptosis through AMPK-dependent inhibition of UPR signaling in ALL lymphoblasts. **PloS One**, v. 8, n. 8, p. e74420, Aug. 2013.

LEIBO, S. P.; LOSKUTOFF, N. M. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 39, n. 1, p. 81-94, Jan. 1993.

LEIDENFROST, S.; BOELHAUVE, M.; REICHENBACH, M.; GUNGOR, T.; REICHENBACH, H. D.; SINOWATZ, F.; WOLF, E.; HABERMANN, F. A. Cell arrest and cell death in mammalian preimplantation development: lessons from the bovine model. **PloS One**, v. 6, n. 7, p. e22121, Jul. 2011.

LEQUARRE, A. S.; VIGNERON, C.; RIBAUCCOUR, F.; HOLM, P.; DONNAY, I.; DALBIES-TRAN, R.; CALLESEN, H.; MERMILLOD, P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology**, v. 63, n. 3, p. 841–859, Feb. 2005.

LI, F.; CUI, L.; YU, D.; HAO, H.; LIU, Y.; ZHAO, X.; PANG, Y.; ZHU, H.; DU, W. Exogenous glutathione improves intracellular glutathione synthesis via the  $\gamma$ -glutamyl cycle in bovine zygotes and cleavage embryos. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 5, p. 7384–7394, May. 2019.

LIMA, M. R.; SARAIVA, N. Z.; OLIVEIRA, C. S.; GARCIA, J. M. The use of linoleic acid in in vitro culture of bovine embryos and its effects on production and survival to vitrification. **Animal Reproduction**, Cabo de Santo Agostinho, p. 894, Jul./Sep. 2017. Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 2017, [Cabo de Santo Agostinho, PE].

LIPINSKA, P.; SELL-KUBIAK, E.; PAWLAK, P.; MADEJA, Z. E.; WARZYCH, E. Response of Bovine Cumulus-Oocytes Complexes to Energy Pathway Inhibition during In Vitro Maturation. **Genes**, v. 12, n. 6, p. 838, May. 2021.

LIM, J. M.; LEE, B. C.; LEE, E. S.; CHUNG, H. M.; KO, J. J.; PARK, S. E.; CHA, K. Y.; HWANG, W. S. In vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes cultured in a chemically defined, protein-free medium: effects of carbohydrates and amino acids. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 11, n. 2, p. 127–132. 1999.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 3479S–3485S, Dec. 2004.

LODDE, V.; MODINA, S.; GALBUSERA, C.; FRANCIOSI, F.; LUCIANO, A. M. 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, Jun. 2007.

LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; YANG, X.; BOLAND, M. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. **Molecular Reproduction Development**, v. 57, n. 2, p. 204–209, Oct. 2000.

LONERGAN, P.; FAERGE, I.; HYTTEL, P. M.; BOLAND, M.; FAIR, T. Ultrastructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest in vitro using roscovitine or butyrolactone. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64, n. 3, p. 369–378, Mar. 2003.

LUCIANO, A. M.; FRANCIOSI, F.; MODINA, S. C.; LODDE, V. Gap junction-mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism(s). **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 6, p. 1252–1259, Dec. 2011.

LUND, J.; AAS, V.; TINGSTAD, R. H.; HEES, A. V.; NIKOLIC, N. Utilization of lactic acid in human myotubes and interplay with glucose and fatty acid metabolism. **Scientific Reports**, v. 8, n. 9814, p. 1-14, Jun. 2018.

LUVONI, G. C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B. G. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. **Molecular Reproduction and Development**, v. 43, n. 4, p. 437-443, Apr. 1996.

MÁ, L.; WEI, J.; WAN, J.; WANG, W.; WANG, L.; YUAN, Y.; YANG, Z.; LIU, X.; MING, L. Low glucose and metformin-induced apoptosis of human ovarian cancer cells is connected to ASK1 via mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-associated pathways. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 1, p. 77, Feb. 2019.

MAHMOUDZADEH, A. R.; SOOM, A. V.; BOLS, P.; YSEBAERT, M. T.; KRUIF, A. Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced in vitro: effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, n. 1, p. 33–39, Jan. 1995.

MAREI, W. F.; GHAFARI, F.; FOULADI-NASHTA, A. A. Role of hyaluronic acid in maturation and further early embryo development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 670–677, Aug. 2012.

MARÍN-AGUILAR, F.; PAVILLARD, L. E.; GIAMPIERI, F.; BULLÓN, P.; CORDERO,

M. D. Adenosine Monophosphate (AMP)-Activated Protein Kinase: A New Target for Nutraceutical Compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 288, Jan. 2017.

MARQUES, T. C.; SANTOS, E. C. D. S.; DIESEL, T. O.; MARTINS, C. F.; CUMPA, H. C. B.; LEME, L. O.; DODE, M. A. N. ; ALVES, B. G.; COSTA, F. P. H.; OLIVEIRA, E. B.; GAMBARINI, M. L. Blastocoel fluid removal and melatonin supplementation in the culture medium improve the viability of vitrified bovine embryos. **Theriogenology**, v. 160, p. 134–141, Jan. 2021.

MATOS, D. G.; FURNUS, C. C.; MOSES, D. F. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1420–1425, Dec. 1997.

MATOS, D. G.; FURNUS, C. C.; MOSES, D. F.; MARTINEZ, A. G.; MATKOVIC, M. Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, n. 4, p. 451-457, Dec. 1996.

MATWEE, C.; BETTS, D. H.; KING, W. A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, v. 8, n. 1, p. 57–68, Feb. 2000.

MAZIERO, R.; GUAITOLINI, C.; PASCHOAL, D. M.; CRESPILO, A. M.; MONTEIRO, B. A.; LIMA, J. S.; SESTARI, D.; LANDIM-ALVARENGA, F. Treatment with roscovitine and butyrolactone I prior to *in vitro* maturation alters blastocyst production. **Zygote**, v. 28, n. 1, p. 24–31, Feb. 2020.

MCGEADY, T. A.; QUINN, P. J.; FITZPATRICK, E. S.; RYAN, M. T.; CAHALAN, S. Gastrulation. *In*: MCGEADY, T. A.; QUINN, P. J.; FITZPATRICK, E. S.; RYAN, M. T.; CAHALAN, S. **Veterinary Embryology**. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. p. 34-41.

MEIRELLES, F. V.; CAETANO, A. R.; WATANABE, Y. F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S. F.; MERIGHE, G. K.; GARCIA, S. M. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 13–20, Jul. 2004.

MORADO, S. A.; CETICA, P. D.; BECONI, M. T.; DALVIT, G. C. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. **Reproduction, Fertility and**

**Development**, v. 21, n. 4, p. 608-614, Apr. 2009.

MORADO, S.; CETICA, P.; BECONI, M.; THOMPSON, J. G.; DALVIT, G. C. Reactive oxygen species production and redox state in parthenogenetic and sperm-mediated bovine oocyte activation. **Reproduction**, v. 145, n. 5, p. 471–478, Apr. 2013.

MOTA, G. B.; SILVA, S. I.; SOUZA, D. K.; TUANY, F.; PEREIRA, M. M.; CAMARGO, L. S.; SILVA, R. A. A. Insulin influences developmental competence of bovine oocytes cultured in  $\alpha$ -MEM plus follicle-stimulating hormone. **Zygote**, v. 23, n. 4, p. 563–572, Aug. 2015.

NAGANO, M.; KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, Y. Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential. **Zygote**, v. 14, n. 1, p. 53–61, Feb. 2006.

NEDAMBALE, T. L.; DINNYÉS, A.; GROEN, W.; DOBRINSKY, J. R.; TIAN, X. C.; YANG, X. Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v. 62, n. 3-4, p. 437–449, Aug. 2004.

NEGRON-PEREZ, V. M.; HANSEN, P. J. The bovine embryo hatches from the zona pellucida through either the embryonic or abembryonic pole. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 34, n. 6, p. 725–731, Jun. 2017.

NIEMANN, H.; LAMPETER, W. W.; SACHER, B.; KRUFF, B. Comparison of survival rates of day 7 and day 8 bovine embryos after fast freezing and thawing. **Theriogenology**, v. 18, n. 4, p. 445-452, Oct. 1982.

NIKAWA, T.; SCHULZ, W. A.; BRINK, C. E.; HANUSCH, M.; SAAG, P.; STAHL, W.; SIES, H. Efficacy of all-trans-beta-carotene, canthaxanthin, and all-trans-, 9-cis-, and 4-oxoretinoic acids in inducing differentiation of an F9 embryonal carcinoma RAR beta-lacZ reporter cell line. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 316, n. 2, p. 665–672, Feb. 1995.

NISHAD, A.; NASEEM, A.; RANI, S.; MALIK, S. Automated qualitative batch measurement of lipid droplets in the liver of bird using ImageJ. **STAR Protocols**, v. 4, n. 3, p. 102466, Sep. 2023.

OLIVEIRA, C. S.; FEUCHARD, V. L. D. S.; MARQUES, S. C. S.; SARAIVA, N. Z. Modulation of lipid metabolism through multiple pathways during oocyte maturation and embryo culture in bovine. **Zygote**, v. 30, n. 2, p. 258–266, Apr. 2022.

OLIVEIRA, C. S.; FEUCHARD, V. L. D. S. C.; ROSA, P. M. D. S.; CAMARGO, A. J. D. R.; SARAIVA, N. Z. In-straw warming protocol improves survival of vitrified embryos and allows direct transfer in cattle. **Cryobiology**, v. 97, p. 222–225, Dec. 2020.

OLIVEIRA, C. S.; SARAIVA, N. Z.; OLIVEIRA, L. Z. Morphology of 16-cell embryo in bovine: Inside cells, compaction, fragmentation and effects of X-sorted semen. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 53, n. 1, p. e13015, Jan. 2024.

OLSON, S. E.; SEIDEL, G. E. Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 2, p. 248–252, Feb. 2000.

OLZMANN, J. A.; CARVALHO, P. Dynamics and functions of lipid droplets. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 3, p. 137–155, Mar. 2019.

OSEIKRIA, M.; ELIS, S.; MAILLARD, V.; CORBIN, E.; UZBEKOVA, S. N-3 polyunsaturated fatty acid DHA during IVM affected oocyte developmental competence in cattle. **Theriogenology**, v. 85, n. 9, p. 1625–1634, Jun. 2016.

OUSLIMANI, N.; PEYNET, J.; BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; THÉRON, P.; LEGRAND, A.; BEAUDEUX, J. L. Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 54, n. 6, p. 829–834, Jun. 2005.

OWEN, M. R.; DORAN, E.; HALESTRAP, A. P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. **The Biochemical Journal**, v. 348, n. 3, p. 607–614, Jun. 2000.

OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N.; TACHIKAWA, S.; SUZUKI, T. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. **Theriogenology**, v. 48, n. 5, p. 769–774, Oct. 1997.

PACZKOWSKI, M.; STRAUSS, K. J.; HERRICK, J. R.; PRATHER, R. S.; SCHOOLCRAFT, W. B.; KRISHER, R. L. Gene Expression suggests mouse and

bovine pre-implantation embryos utilize the Warburg Effect. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 1, p. 66, Aug. 2012.

PARK, J. Y.; SU, Y. Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S. L.; CONTI, M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v. 303, n. 5658, p. 682–684, Jan. 2004.

PASQUARIELLO, R.; MANZONI, E. F. M.; FIANDANESE, N.; VIGLINO, A.; POCAR, P.; BREVINI, T. A. L.; WILLIAMS, J. L.; GANDOLFI, F. Implications of miRNA expression pattern in bovine oocytes and follicular fluids for developmental competence. **Theriogenology**, v. 145, p. 77–85, Mar. 2020.

PAP, E. H.; DRUMMEN, G. P.; WINTER, V. J.; KOOIJ, T. W.; RIJKEN, P.; WIRTZ, K. W.; KAMP, O. J. A.; HAGE, W. J.; POST, J. A. Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-BODIPY(581/591). **FEBS Letters**, v. 453, n. 3, p. 278–282, Jun. 1999.

PASCHOAL, D. M.; SUDANO, M. J.; GUASTALI, M. D.; DIAS MAZIERO, R. R.; CROCOMO, L. F.; MAGALHÃES, O. L. C.; RASCADO, S. T.; MARTINS, A.; LANDIM-ALVARENGA, C. F. Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. **Zygote**, v. 22, n. 2, p. 146–157, May. 2014.

PASCHOAL, D. M.; SUDANO, M. J.; SCHWARZ, K. R. L.; MAZIERO, R. R. D.; GUASTALI, M. D.; CROCOMO, L. F.; MAGALHÃES, L. C. O.; MARTINS, A.; LEAL, C. L. V. ; LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. Cell apoptosis and lipid content of in vitro-produced, vitrified bovine embryos treated with forskolin. **Theriogenology**, v. 87, p. 108–114, Jan. 2017.

PAULA, C. L. A.; ANDRZEJEWSKI, J.; JULIAN, D.; SPICER, L. J.; HANSEN, P. J. Oxygen and steroid concentrations in preovulatory follicles of lactating dairy cows exposed to acute heat stress. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 805–813, Apr. 2008.

PIKIOU, O.; VASILAKI, A.; LEONDARITIS, G.; VAMVAKOPOULOS, N.; MESSINIS, I. E. Effects of metformin on fertilisation of bovine oocytes and early embryo development: possible involvement of AMPK3-mediated TSC2 activation. **Zygote**, v. 23, n. 1, p. 58–67, Feb. 2015.

PRASTOWO, S.; AMIN, A.; RINGS, F.; HELD, E.; SALILEW, S. D.; GAD, A.; NEUHOFF, C.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D.; HOELKER, M. Fateful triad of reactive oxygen species, mitochondrial dysfunction and lipid accumulation is associated with expression outline of the AMP-activated protein kinase pathway in bovine blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 5, p. 890-905, Feb. 2016.

QUINTÃO, C. C. R. **Estratégias para redução do conteúdo lipídico e estresse oxidativo visando otimizar o desenvolvimento pré-implantacional e a criotolerância de embriões bovinos produzidos in vitro**, 2023. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 2023.

RAMOS-IBEAS, P.; GIMENO, I.; CAÑÓN-BELTRÁN, K.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; RIZOS, D.; GÓMEZ, E. Senescence and Apoptosis During in vitro Embryo Development in a Bovine Model. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 619902, Dec. 2020.

RIZOS, D.; WARD F.; DUFFY P.; BOLAND M. P.; LONERGAN P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 2, p. 234-248, Feb. 2002.

ROCHA-FRIGONI, N. A.; LEÃO, B. C.; DALL'ACQUA, P. C.; MINGOTI, G. Z. Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured in vitro with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development. **Theriogenology**, v. 86, n. 8, p. 1897-1905, Nov. 2016.

ROCHA-FRIGONI, N. A.; LEÃO, B. C.; NOGUEIRA, É.; ACCORSI, M. F.; MINGOTI, G. Z. 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, Apr. 2015.

ROOKE, J. A.; WATT, R. G.; ASHWORTH, C. J.; MCEVOY, T. G. Inclusion of bovine lipoproteins and the vitamin E analogue, Trolox, during in vitro culture of bovine embryos changes both embryo and fetal development. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 24, n. 2, p. 309–316, Oct. 2012.

SANCHES, B. V.; MARINHO, L. S.; FILHO, B. D.; PONTES, J. H.; BASSO, A. C.; MEIRINHOS, M. L.; SILVA-SANTOS, K. C.; FERREIRA, C. R.; SENEDA, M. M. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. **Theriogenology**, v. 80, n. 4, p. 372–377, Sep. 2013.

SANCHEZ-LAZO, L.; BRISARD, D.; ELIS, S.; MAILLARD, V.; UZBEKOV, R.; LABAS, V.; DESMARCHAIS, A.; PAPILLIER, P.; MONGET, P.; UZBEKOVA, S. Fatty acid synthesis and oxidation in cumulus cells support oocyte maturation in bovine. **Molecular Endocrinology**, v. 28, n. 9, p. 1502–1521, Sep. 2014.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, v. 45, n. 3, p. 528–537, Feb. 2000.

SAX, J. K.; DASH, B. C.; HONG, R.; DICKER, D. T.; EL-DEIRY, W. S. The cyclin-dependent kinase inhibitor butyrolactone is a potent inhibitor of p21 (WAF1/CIP1 expression). **Cell Cycle**, v. 1, n. 1, p. 90–96, Jan. 2002.

SHEBLI, W. **Efeito da adição da cantaxantina na produção de embriões bovinos in vitro**, 2018. Dissertação (Mestrado em Sanidade e Reprodução de Ruminantes), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, PE, 2018.

SHIHAN, M. H.; NOVO, S. G.; MARCHAND, S. J.; WANG, Y.; DUNCAN, M. K. A simple method for quantitating confocal fluorescent images. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 25, p. 100916, Feb. 2021.

SIRARD, M. A.; FLORMAN, H. M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; BARNES, F. L.; SIMS, M. L.; FIRST, N. L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 6, p. 1257–1263, Jun. 1989.

SMITH, D. G.; STURMEY, R. G. Parallels between embryo and cancer cell metabolism. **Biochemical Society Transactions**, v. 41, n. 2, p. 664–669, Abr. 2013.

SONG, J.; REN, P.; ZHANG, L.; WANG, X. L.; CHEN, L.; SHEN, Y. H. Metformin reduces lipid accumulation in macrophages by inhibiting FOXO1-mediated transcription of fatty acid-binding protein 4. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 1, p. 89–94, Feb. 2010.

SOSA, F.; ROMO, S.; KJELLAND, M. E.; ÁLVAREZ-GALLARDO, H.; PÉREZ-

REYNOZO, S.; URBÁN-DUARTE, D.; TORRE-SÁNCHEZ, J. F. Effect of pterostilbene on development, equatorial lipid accumulation and reactive oxygen species production of in vitro-produced bovine embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 11, p. 1490–1500, Nov. 2020.

SOTO-HERAS, S.; PARAMIO, M.T. Impact of oxidative stress on oocyte competence for in vitro embryo production programs. **Research in Veterinary Science**, v. 132, p. 342–350, Oct. 2020.

SOVERNIGO, T. C.; ADONA, P. R.; MONZANI, P. S.; GUEMRA, S.; BARROS, F.; LOPES, F. G.; LEAL, C. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 4, p. 561–569, Aug. 2017.

STEPHENNE, X.; FORETZ, M.; TALEUX, N.; ZON, G. C.; SOKAL, E.; HUE L.; VIOLLET, B.; GUIGAS, B. Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. **Diabetologia**, v. 54, n. 12, p. 3101-1310, Sep. 2011.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 3, p. 904–909, Mar. 2001.

SU, L. J.; ZHANG, J. H.; GOMEZ, H.; MURUGAN, R.; HONG, X.; XU, D.; JIANG, F.; PENG, Z. Y. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 5080843, Oct. 2019.

SUDANO, M. J.; MATTOS, M. C. C.; FERNANDES, C. B.; MAZIEIRO, R. R.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. In vitro production of bovine embryos using Sigma antioxidant supplement®,  $\alpha$ -tocopherol and L-ascorbic acid. **Animal Reproduction**, v. 7, n. 1, p. 42-48, Jan/Mar. 2018.

SUDANO, M. J.; PASCHOAL, D. M.; RASCADO, T. S.; MAGALHÃES, L. C.; CROCOMO, L. F.; LIMA-NETO, J. F.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Lipid content and

apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1211–1220, Apr. 2011.

SUDANO, M. J.; RASCADO, T. D.; TATA, A.; BELAZ, K. R.; SANTOS, V. G.; VALENTE, R. S.; MESQUITA, F. S.; FERREIRA, C. R.; ARAÚJO, J. P.; EBERLIN, M. N.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. Lipidome signatures in early bovine embryo development. **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p. 472–484, Jul. 2016.

SUGIMURA, S.; KOBAYASHI, N.; OKAE, H.; YAMANOUCHI, T.; MATSUDA, H.; KOJIMA, T.; YAJIMA, A.; HASHIYADA, Y.; KANEDA, M.; SATO, K.; IMAI, K.; TANEMURA, K.; ARIMA, T.; GILCHRIST, R.B. Transcriptomic signature of the follicular somatic compartment surrounding an oocyte with high developmental competence. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 6815, Jun. 2017.

SUN, W. J.; PANG, Y. W.; LIU, Y.; HAO, H. S.; ZHAO, X. M.; QIN, T.; ZHU, H. B.; DU, W. H. Exogenous glutathione supplementation in culture medium improves the bovine embryo development after in vitro fertilization. **Theriogenology**, v. 84, n. 5, p. 716–723, Sep. 2015.

SUTTON, M. L.; CETICA, P. D.; BECONI, M. T.; KIND, K. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. **Reproduction**, v. 126, n. 1, p. 27-34, Jul. 2003.

SUTTON-MCDOWALL, M. L.; FEIL, D.; ROBKER, R. L.; THOMPSON, J. G.; DUNNING, K. R. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. **Theriogenology**, v. 77, n. 8, p. 1632–1641, May. 2012.

SUZUKI, H.; YANG, X.; FOOTE, R. H. Surface alterations of the bovine oocyte and its investments during and after maturation and fertilization in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 38, n. 4, p. 421–430, Aug. 1994.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; HAMANO, S.; KUWAYAMA, M.; OKAMURA, N.; OKANO, A. Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 2, p. 228–232, Aug. 1993.

TAKEO, S.; SATO, D.; KIMURA, K.; MONJI, Y.; KUWAYAMA, T.; KAWAHARA-MIKI, R.; IWATA, H. Resveratrol improves the mitochondrial function and fertilization outcome of bovine oocytes. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 60, n. 2, p. 92–99, Apr. 2014.

TALLEY, J. T.; MOHIUDDIN, S. S. **Biochemistry, Fatty Acid Oxidation**. Treasure Island: Florida Stat Pearls Publishing, 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556002/>>. Acesso em: 30 jul. 2023.

THOMAS, R. E.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 3, p. 548–556, Mar. 2004.

THOMAS, R. E.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. **Developmental Biology**, v. 244, n. 2, p. 215–225, Apr. 2002.

THOMPSON, J. G.; PARTRIDGE, R. J.; HOUGHTON, F. D.; COX, C. I.; LEESE, H. J. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, n. 2, p. 299–306, Mar. 1996.

TIAN, Y. Q.; LI, X. L.; WANG, W. J.; HAO, H. S.; ZOU, H. Y.; PANG, Y. W.; ZHAO, X. M.; ZHU, H. B.; DU, W. H. Knockdown of bone morphogenetic protein 4 gene induces apoptosis and inhibits proliferation of bovine cumulus cells. **Theriogenology**, v. 188, p. 28–36, Aug. 2022.

aTORRE-SANCHEZ, J. F.; GARDNER, D. K.; PREIS, K.; GIBBONS, J.; SEIDEL, G. E. Metabolic regulation of in vitro-produced bovine embryos. II. Effects of phenazine ethosulfate, sodium azide and 2,4-dinitrophenol during post-compaction development on glucose metabolism and lipid accumulation. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 18, n. 5, p. 597–607, May. 2006.

bTORRE-SANCHEZ, J. F.; PREIS, K.; SEIDEL, G. E. Metabolic regulation of in-vitro-produced bovine embryos. I. Effects of metabolic regulators at different glucose concentrations with embryos produced by semen from different bulls. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 18, n. 5, p. 585–596, Mar. 2006.

TOSCA, L.; UZBEKOVA, S.; CHABROLLE, C.; DUPONT, J. Possible role of 5' AMP-activated protein kinase in the metformin-mediated arrest of bovine oocytes at the germinal vesicle stage during in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 3, p. 452-465, Sep. 2007.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of Physiology**, v. 552, n. 2, p. 335-344, Oct. 2003.

UHDE, K.; VAN TOL, H. T. A.; STOUT, T. A. E.; ROELEN, B. A. J. Metabolomic profiles of bovine cumulus cells and cumulus-oocyte-complex-conditioned medium during maturation in vitro. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9477, Jun. 2018.

VALENTE, R. S.; ALMEIDA, T. G.; ALVES, M. F.; PASCHOAL, D. M.; BASSO, A. C.; SUDANO, M. J. Cellular and apoptotic status monitoring according to the ability and speed to resume post-cryopreservation embryonic development. **Theriogenology**, v. 158, p. 290-296, Dec. 2020.

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

WADA, M.; HOSOTANI, R.; LEE, J. U.; DOI, R.; KOSHIBA, T.; FUJIMOTO, K.; MIYAMOTO, Y.; TSUJI, S.; NAKAJIMA, S.; OKUYAMA, A.; IMAMURA, M. An exogenous cdk inhibitor, butyrolactone-I, induces apoptosis with increased Bax/Bcl-2 ratio in p53-mutated pancreatic cancer cells. **Anticancer Research**, v. 18, n. 4A, p. 2559–2566, Jul-Aug. 1998.

WANG, F.; NAOWAROJNA, N.; ZOU, Y. Stratifying ferroptosis sensitivity in cells and mouse tissues by photochemical activation of lipid peroxidation and fluorescent imaging. **STAR Protocols**, v. 3, n. 2, p. 101189, Mar. 2022.

WANG, L.; XU, X.; TENG, M.; ZHAO, G.; LEI, A. Coping with DNA Double-Strand Breaks via ATM Signaling Pathway in Bovine Oocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 8892, Nov. 2020.

WHEATON, W. W.; WEINBERG, S. E.; HAMANAKA, R. B.; SOBERANES, S.; SULLIVAN, L. B.; ANSO, E.; GLASAUER, A.; DUFOUR, E.; MUTLU, G. M.; BUDIGNER, G. S.; CHANDEL, N. S. Metformin inhibits mitochondrial complex I of

cancer cells to reduce tumorigenesis. **eLife**, v.3, p. e02242, May. 2014.

WU, B.; IGNOTZ, G.; CURRIE, B. W.; YANG, X. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 1, p. 253-259, Jan. 1997.

XI, G.; AN, L.; JIA, Z.; TAN, K.; ZHANG, J.; WANG, Z.; ZHANG, C.; MIAO, K.; WU, Z.; TIAN, J. Natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) localized in bovine oocyte underlies a unique mechanism for C-type natriuretic peptide (CNP)-induced meiotic arrest. **Theriogenology**, v. 106, p. 198–209, Jan. 2018.

XU, D.; WU, L.; JIANG, X.; YANG, L.; CHENG, J.; CHEN, H.; HUA, R.; GENG, G.; YANG, L.; LI, Q. SIRT2 Inhibition Results in Meiotic Arrest, Mitochondrial Dysfunction, and Disturbance of Redox Homeostasis during Bovine Oocyte Maturation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, p. 1365, Mar. 2019.

YANG, M. Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 70, n. 3-4, p. 159–169, Apr. 2002.

YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P. E.; PRESICCE, G. A. Control of oocyte maturation in cows--biological factors. **Theriogenology**, v. 49, n. 2, p. 471–482, Jan. 1998.

YANG, L.; WEI, Q.; GE, J.; ZHAO, X.; MA, B. MAPK3/1 is conducive to luteinizing hormone-mediated C-type natriuretic peptide decrease in bovine granulosa cells. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 62, n. 2, p. 137–142, Apr. 2016.

YNSAURRALDE-RIVOLTA, A. E.; SUVÁ, M.; LUCHETTI, C. G.; BEVACQUA, R. J.; MUNILLA, S.; RODRIGUEZ-ALVAREZ, L.; VELASQUEZ, A.; BRISKI, O.; LOMBARDO, D.; SALAMONE, D. DMSO supplementation during in vitro maturation of bovine oocytes improves blastocyst rate and quality. **Theriogenology**, v. 148, p. 140–148, May. 2020.

ZANG, M.; ZUCCOLLO, A.; HOU, X.; NAGATA, D.; WALSH, K.; HERSCOVITZ, H.; BRECHER, P.; RUDERMAN, N. B.; COHEN, R. A. AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2

cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 46, p. 47898–47905, Nov. 2004.

ZHANG, S.; WANG, C. Precise Analysis of Nanoparticle Size Distribution in TEM Image. **Methods and Protocols**, v. 6, n. 4, p. 63, Aug. 2023.

ZHANG, T.; ZHANG, C.; FAN, X.; LI, R.; ZHANG, J. Effect of C-type natriuretic peptide pretreatment on in vitro bovine oocyte maturation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal**, v. 53, n. 3, p. 199–206, Mar. 2017.

ZHAO, X. M.; WANG, N.; HAO, H. S.; LI, C. Y.; ZHAO, Y. H.; YAN, C. L.; WANG, H. Y.; DU, W. H.; WANG, D.; LIU, Y.; PANG, Y. W.; ZHU, H. B. Melatonin improves the fertilization capacity and developmental ability of bovine oocytes by regulating cytoplasmic maturation events. **Journal of Pineal Research**, v. 64, n. 1, p. 12445, Jan. 2018.

ZOLINI, A. M.; CARRASCAL-TRIANA, E.; KING, R. A.; HANSEN, P. J.; ALVES TORRES, C. A.; BLOCK, J. Effect of addition of l-carnitine to media for oocyte maturation and embryo culture on development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. **Theriogenology**, v. 133, p. 135–143, Jul. 2019.

## APÊNDICE A - Supplementation of *in vitro* maturation medium with metformin improves the development of bovine *in vitro*-fertilized oocytes toward expanded blastocyst stage

Wasim Al Shebli<sup>1</sup>, Naiara Zoccal Saraiva<sup>2</sup>, Carolina Capobianco Romano Quintão<sup>2</sup>, Clara Slade Oliveira<sup>2</sup>, Eliza Diniz de Souza<sup>2</sup>, Maria Angélica Quintão Barros<sup>3</sup>, Luiz Sérgio de Almeida Camargo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program of post-graduation in veterinary medicine, federal university of Viçosa, Viçosa-Minas Gerais-Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Animal Reproduction, Brazilian Agricultural Research Corporation, Embrpa Dairy Cattle, Juiz de Fora-Minas Gerais-Brazil

<sup>3</sup>Gênese Laboratory of Reproduction Biotechnology, Juiz de Fora-Minas Gerais-Brazil

The rising demands of recruiting *in vitro*-produced embryos for optimizing cattle husbandry encounters some limitations, including the inferior female gamete competence regarding its *in vivo* counterpart. This attributes to degenerative effects mediated by elevated reactive oxygen (ROS) generation in the artificial environment. However, oxidants neutralization attends moderately the expectations, so further antioxidant activity may remarkably enhance oocyte potential, like inhibiting free radical liberation from the respiratory chain as performed by metformin (MT). To test our hypothesis, *cumulus*-oocyte complexes (COCs) obtained by puncturing the visible antral follicles of abattoir ovaries were selected, basing on the surrounding cells ( $\geq 3$  compacted layers) along with ooplasm appearance (opaque homogeneous) and randomly distributed in four groups with different concentrations of MT during *in vitro* maturation for 22-24h: MT0=0 (n=139), MT1=0.05 (n=142), MT2=0.1 (n=143) and MT3=0.2 mM (n=151). The *in vitro*-matured COCs were placed in *in vitro* fertilization (IVF) medium containing spermatozoa (concentration=  $2 \times 10^6$  per ml) previously separated with mini Percoll gradient; 18 h later the presumptive zygotes were partially denuded and cultured in synthetic oviduct fluid (SOF) + 3% fetal calf serum. Cleavage and blastocyst (BL) rates from six replicates were observed at 48 and 168 h following IVF. Then, 4-5 BLs/group produced from MT0 (n= 18) and MT2 (n= 22) in five independent replications, were submitted to terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) assay and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to visualize the apoptotic and viable blastomeres respectively, under a florescent microscope (EVOS M5000 microscope, Invitrogen). The qualitative variances (*in vitro* embryo production results) were analyzed using logistic regression and chi-square. Total cell number and apoptosis index (+TUNEL/blastomeres %) were analyzed by One-Way ANOVA (SAS university software, version9.1); the difference considered significant when  $P \leq 0.05$ . The data are expressed as mean $\pm$ SEM. MT had no effect ( $P > 0.05$ ) on cleavage (78.8 $\pm$ 3.2, 76 $\pm$ 3.3, 75.5 $\pm$ 2.9, and 76.6 $\pm$ 3.6% for MT0, MT1, MT2, and MT3, respectively) and blastocyst (46.4 $\pm$ 7.1, 48 $\pm$ 4.5, 40.8 $\pm$ 2.8, and 44.3 $\pm$ 5% for MT0, MT1, MT2, and MT3, respectively) rates. The rate of embryos at blastocyst stage was lower ( $P < 0.05$ ) in MT2 (3.3 $\pm$ 1.8%) than in MT0 (14.5 $\pm$ 3.4%), MT1 (7.3 $\pm$ 2.7%) and MT3 (8.8 $\pm$ 3%), whereas rate of embryos at blastocyst expanded stage (27.5 $\pm$ 1.8%) was higher ( $P < 0.05$ ) than MT0 (18.1 $\pm$ 4.8%) with no difference ( $P > 0.05$ ) among MT0, MT1 (26.5 $\pm$ 5%) and MT3 (24.6 $\pm$ 14%). The percentage of the embryos at remaining blastocyst stages presented no difference ( $P > 0.05$ ) among groups (early blastocyst: 10.9 $\pm$ 2, 12.7 $\pm$ 2.8, 9.3 $\pm$ 2 and 9.6 $\pm$ 1.6%; hatching blastocyst: 1.39 $\pm$ 1.3, 0.83 $\pm$ 0.8, 0 and 0.72 $\pm$ 0.7% or hatched blastocyst: 1.39 $\pm$ 1.3, 0.57 $\pm$ 0.5, 0.69 $\pm$ 0.6 and 0.52 $\pm$ 0.5%, for MT0, MT1, MT2 and MT3, respectively). Total cell number (173.77 $\pm$ 7) and apoptosis index (19.45 $\pm$ 2.12%) in MT2 were higher ( $P < 0.05$ ) than in MT0 (138.33 $\pm$ 11.12 and 13.20 $\pm$ 1.54%). In conclusion, 0.1 mM metformin added to the *in vitro* maturation medium favors the development of zygotes towards expanded blastocyst stage, although no effect on overall blastocyst production was found. Considering that the blastocysts at expanded stage are usually the preferred category for vitrification, metformin can be useful to generate embryos with the aim of cryopreservation. Nevertheless, the role of metformin on apoptosis in blastocyst requires further investigation. Financial support: CNPq and Fapemig.

Keywords: Antioxidants; respiratory chain; expanded blastocyst.

**Animal Reproduction**, Fortaleza, v. 21, n. 3, p. 31, Jul. 2024. Presented work in X International Symposium on Animal Biology of Reproduction (ISABR), 2024, [Fortaleza, CE].

## APÊNDICE B - Metformin ameliorates bovine zygotes development

Wasim Al Shebli<sup>1</sup>, Naiara Zoccal Saraiva<sup>2</sup>, Carolina Capobianco Romano Quintão<sup>2</sup>, Clara Slade Oliveira<sup>2</sup>, Eliza Diniz de Souza<sup>2</sup>, Maria Angélica Quintão Barros<sup>3</sup>, Luiz Sérgio de Almeida Camargo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fundação Universidade Federal de Viçosa, <sup>2</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, <sup>3</sup>Gênese Biotecnologia em Reprodução Animal Ltda

In vitro embryo production experiences some obstacles to its utilization in livestock system, like unsatisfactory yield besides suboptimal quality of resultant structures, owing that to many factors such as the cellular damages mediated by elevated reactive oxygen species (ROS) generation under in vitro conditions. The present work aimed to improve blastocyst outcome and viability via the addition of metformin (MET), which inhibits oxidants release from the respiratory chain. Cumulus-oocyte complexes (COCs) punctured from antral follicles (3-6 mm in diameter) of abattoir ovaries, were matured for 24 h, and then co-incubated in fertilization medium (20 µg/ml heparin) with sperm (2 million per ml) previously separated by mini-Percoll gradients. After 18 h presumptive zygotes were partially denuded, placed in culture media (synthetic oviductal fluid containing 3% fetal calf serum) supplemented with MET as following: 0 (MET0, n=106), 0.05 (MET1, n=107), 0.1 (MET2, n=111) and 0.2 mM (MET3, n=118), and cultured under 5% CO<sub>2</sub>, 38.5°C and saturated humidity. At 48 and 168 h post fertilization, the cleavage and blastulation were verified (six replicates), and 5-6 blastocysts/group from four replicates were submitted to terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) assay (DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System, Promega, Madison, USA) in order to evaluate the apoptosis index and total cell number. Data of cleavage and blastocyst rates and apoptosis index were analyzed by binary logistic regression (Proc Logistic) and total cell number was analyzed by linear mixed model (Proc Mixed) using the SAS Analytics software (version 9.1), considering the difference significant when  $P \leq 0.05$ . Cleavage rates were similar ( $P > 0.05$ ) among MET0 (90.9±2%), MET1 (88.4±1.4%), MET2 (85.3±3%) and MET3 (87.9±2.8%). The highest blastocyst rate ( $P < 0.05$ ) was found in MET1 (60.3±2.5%) when compared to others (MET0=43.6±7.3, MET2=30.4±3.7 and MET3=48.1±6.1%) whereas blastocyst rate in MET2 was lower ( $P < 0.05$ ) than in MET3. No difference ( $P > 0.05$ ) was found between MET0 and MET3. In MET0, the blastocyst total cell number (114.4±8.1) did not differ ( $P > 0.05$ ) from MET1 (106.2±6.8) and MET3 (101.5±5.4), but it was higher ( $P < 0.05$ ) than in MET2 (90.2±4.6). No difference ( $P > 0.05$ ) was found among MET1, MET2 and MET3. Apoptosis occurrence showed no significant difference ( $P > 0.05$ ) between the treatments (MET1=26.4±1.9%, MET2=27.9±1.9% and MET3=22.9±2%); however, the MET0 presented a lower ( $P < 0.05$ ) apoptosis index (24.5±2.5%) than MET1 and MET2. In conclusion, metformin contributes to blastocyst production in a dose dependent manner. Dose of 0.1 mM metformin can be proposed as additive to embryo culture medium to enhance embryo production, although it does not reduce the apoptosis incidence. Financial support: CAPES, FAPEMIG and CNPq.

Keywords: Cattle; Blastocysts; apoptosis

**Animal Reproduction**, Atibaia, v. 21, n. 3, p. 99, Aug. 2024. Presented work in XXXVII Annual Meeting of the Brazilian embryo technology society (SBTE), 2024, [Atibaia, SP].

**ANEXO A – Certificado nº 51/202**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA  
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

*Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-900- Telefone: (31) 3612 2315*

**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, CEUA/UFV, certifica que o Processo nº 51/2021, com o Projeto de Pesquisa intitulado, **“Efeito da metformina na competência oocitária bovina e posterior viabilidade embrionária pós-criopreservação”** coordenado pelo(a) professor(a) Luiz Sérgio de Almeida Camargo do Departamento de Veterinária, está de acordo com a legislação vigente, Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008, com as Resoluções Normativas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal, CONCEA e, apresenta especificidade, caracterizando *“A não utilização de animais vivos”*, portanto sendo aprovado por esta comissão em 28 de junho de 2021.

**CERTIFICATE**

The Ethics Committee in Use of Animals of the University of Federal de Viçosa, CEUA-UFV, certify that the 51/2021 Process, with the Research Project titled, **“Effect of metformin on bovine oocyte competence and subsequent post-cryopreservation embryo viability”**, coordinated by Luiz Sérgio de Almeida Camargo teacher of Department of Veterinary, is of according to current legislation, Law No. 11,794, of October 08, 2008, with the Normative Resolutions issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation, CONCEA and, presents specificity, characterizing "Non-use of live animals", therefore being approved by this commission in June 28, 2021.

Prof. Mariella Bontempo Duca de Freitas  
Coordenadora  
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV