

THALITA SOUZA BERTELI

O impacto da estimulação ovariana, fertilização *in vitro*, vitrificação de oócitos e suplementação dos meios de vitrificação com L-carnitina e ácidos graxos no perfil lipídico de oócitos e blastocistos murinos

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientadora: Prof^{ta}. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

Ribeirão Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Berteli, Thalita Souza

O impacto da estimulação ovariana, fertilização *in vitro*, vitrificação de oócitos e suplementação dos meios de vitrificação com L-carnitina e ácidos graxos no perfil lipídico de oócitos e blastocistos murinos /Thalita Souza Berteli; orientadora, Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro. Ribeirão Preto: FMRP, 2022.

105 p.: 13il.; 30 cm

Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

1. Vitrificação de oócitos; 2. L-carnitina; 3. Ácidos graxos; 4. FIV; 5. Estimulação ovariana; 6. Perfil lipídico; 7. Blastocistos.

Nome: BERTELI, Thalita Souza

Título: O impacto da estimulação ovariana, fertilização *in vitro*, vitrificação de oócitos e suplementação dos meios de vitrificação com L-carnitina e ácidos graxos no perfil lipídico de oócitos e blastocistos murinos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em: 11/04/2022

Banca Examinadora

Profª. Dra.: Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

Prof. Dra.: Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr.: Ricardo Marques Azambuja

Instituição: Fertilitat Medicina Reprodutiva

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr.: Sylvia Sanches Cortezzi

Instituição: Cortezzi Pesquisa Científica

Julgamento: Aprovado

Dedico este trabalho aos meus pais Liomarlene e João, minhas irmãs Thamires e Thayná, meu esposo Pedro e minha filha Antonella que sempre me incentivaram neste e nos desafios que ainda estão por vir.

AGREDECIMENTOS

À Deus, minha fé que foi força, esperança e proteção.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro, um exemplo de profissional e ser humano a qual me espelho diariamente; pela oportunidade e por acreditar em meu potencial, pelos ensinamentos, paciência, apoio, e pela dedicação inesgotável ao meu crescimento científico e de todos que a acompanham. Certamente foi um presente tê-la como mentora.

Ao meu orientador durante o período de sanduíche, Dr. David L. Keefe, um grande pesquisador e líder, pela generosidade em me oferecer o máximo de oportunidades que estão sendo fundamentais para meu aprimoramento profissional.

À Dra. Fang Helen Wang, responsável pelo Laboratório de pesquisa do Dr. Keefe na New York University, pela paciência e por todo conhecimento compartilhado durante meu período de sanduíche.

À Dra. Fabiana Barzotto Kohlrausch, pelos ensinamentos, parceria e amizade durante o sanduíche. Seu incentivo e apoio foram muito importantes.

À Dra. Alessandra A. Vireque, pela orientação, parceria, apoio, paciência, pela amizade que este trabalho trouxe e principalmente pela grande paixão que tens pela pesquisa que me motivaram a não desistir frente aos desafios e frustrações.

À Caroline Mantovani da Luz que caminhou comigo nesta jornada, partilhando das lutas, frustrações e vitórias nesta longa trajetória de experimentos. Obrigada pelo incentivo, apoio e amizade ao longo destes anos.

Ao Eduardo Domingos Borges por todo auxílio com o trabalho, pelo incentivo e amizade que foram essenciais para que este trabalho fosse concluído.

À Dra. Christina Ramires Ferreira pelo conhecimento compartilhado, apoio e análises que foram realizadas na Purdue University sob sua supervisão - EUA.

À Fernanda Veronese de Oliveira que participou ativamente do início desta jornada, meu muito obrigado pelo apoio e amizade.

À Marília Alves e a Maria Aparecida Vasconcelos pela ajuda nos experimentos. Obrigada pela amizade e colaboração.

A todos os amigos da pós-graduação, obrigada pelo carinho, amizade e por todos os momentos de descontração.

A todas as funcionárias e amigas do laboratório de GO: Marilda, Camila, Maria Aparecida, Maria Cristina, Roberta, Marisa, Adriana, Gisele, Fabiana, Albina, Tatiana, Auxiliadora, Sandra, Adriana e Océlia. Agradeço pelo carinho de todas.

À minha mãe, meu pai e minhas irmãs por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em meus sonhos. Se cheguei até aqui foi porque me deram a base e apoio necessários sempre.

Ao meu marido Pedro, obrigada por estar sempre ao meu lado me apoiando para que eu nunca desistisse. Essa conquista não seria possível sem seu apoio.

À minha filha Antonella e minha filha de quatro patas, Cookie que foram conforto e amor nos momentos difíceis.

À Suleimy Mazin pelas análises estatísticas, atenção, paciência e apoio.

Aos membros da banca de qualificação Prof. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva e Dra. Alessandra A. Vireque pelos pertinentes apontamentos que engrandeceram esse estudo e aos membros da banca de defesa, Dra. Sylvia Sanches Cortezzi e Dr. Ricardo Marques Azambuja, e novamente à Prof. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa por aceitarem o convite e por todas as considerações valiosas apontadas durante a defesa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) por meio do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX) pelo apoio financeiro durante o Sanduíche e durante meu último ano de Doutorado (Processos n. 88887.371487/2019-00, e n. 88887.597054/2021-00).

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA), a INVITRA – Tecnologia em Reprodução Assistida LTDA, ao INCT – Hormônios e Saúde da Mulher, a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), USP; em especial ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia por fornecerem todo o suporte financeiro e de infra-estrutura para que esse

trabalho fosse realizado.

A todos meu muito obrigada!

“A sabedoria é um paradoxo. O homem que mais sabe é aquele que mais reconhece a vastidão da sua ignorância.”

(Autor desconhecido)

RESUMO

BERTELI, T. S. **O impacto da estimulação ovariana, fertilização *in vitro*, vitrificação de oócitos e suplementação dos meios de vitrificação com L-carnitina e ácidos graxos no perfil lipídico de oócitos e blastocistos murinos.** 2022. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Objetivo: Objetivamos investigar os efeitos do tempo de equilíbrio do protocolo de vitrificação e o impacto de um meio de vitrificação suplementado com ácidos graxos (AG) e L-carnitina (LC) no desenvolvimento embrionário e perfil lipídico de oócitos murinos. Adicionalmente, analisar o impacto da estimulação ovariana, fertilização *in vitro* (FIV) e vitrificação de oócitos com meio padrão e suplementado com AG e LC no perfil lipídico de blastocistos murinos. **Material e métodos:** Estudo experimental incluindo 936 oócitos murinos C57BL/6J, divididos aleatoriamente em FIV fresco (CTR) e grupos de exposição à solução de equilíbrio (ES). Os oócitos foram expostos ao ES dos meios Irvine (IRV), T4vitri-4 (T4) ou T4 suplementado com LC e AG (T4-LC/FA) por 7 ou 10 minutos, vitrificados-aquecidos e submetidos à FIV. Também avaliamos o perfil lipídico de oócitos imediatamente após a exposição a solução de equilíbrio (ES) utilizando os mesmos tempos de equilíbrio. O desenvolvimento embrionário, a análise do perfil lipídico do oócito e análise da via lipídica foram comparados entre os grupos. Também comparamos o perfil lipídico de blastocistos produzidos *in vivo* a partir de ciclos naturais de acasalamento (N), produzidos *in vivo* após superovulação (S) e acasalamento, ou produzidos *in vitro* após superovulação e FIV. Para os experimentos *in vitro*, oócitos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: oócitos frescos fertilizados *in vitro* e grupos vitrificados utilizando os meios de vitrificação descritos previamente. Oócitos frescos ou vitrificados/aquecidos foram inseminados e cultivados *in vitro*. O perfil lipídico dos oócitos e blastocistos foi avaliado por meio de perfil de monitoramento de reações múltiplas (MRM). **Resultados:** O maior tempo de equilíbrio resultou em menores taxas de sobrevivência oocitária e formação de blastocistos, redução da abundância relativa de lipídios estruturais, como fosfatidilcolinas e esfingomielinas, variando de acordo com a composição de ES. Também induziu a formação de bolhas na superfície do oócito predominantemente em IRV, raramente em T4 e ausentes em T4-LC/FA. A fim de revelar as vias metabólicas associadas à fase de equilíbrio da vitrificação, a análise da via lipídica foi realizada e ambos, valores de p e valores de impacto das vias mostraram que o

metabolismo do ácido linoleico ($p=0.00223$; impacto =1) e metabolismo do ácido alfa-linoléico ($p=0.00084$; impact = 0.33) foram as vias mais impactadas, seguida do metabolismo dos glicerofosfolipídios ($p=0.0167$; impact = 0.25). A estimulação ovariana somente ou associada à FIV promoveu um enriquecimento de fosfolipídios saturados em blastocistos. A vitrificação resultou em uma abundância relativa reduzida de fosfolipídios e esfingolipídios em comparação com blastocistos gerados a partir de oócitos frescos de FIV. **Conclusões:** Uma fase de equilíbrio mais longa pode influenciar o desenvolvimento embrionário e induzir mudanças na composição lipídica do oócito relacionadas à integridade da membrana. Os resultados sugerem internalização dos ácidos oleico e linoléico adicionados ao ES pelo oócito e, de certa forma, parecem contribuir para a preservação dos fosfolipídios da membrana, independentemente dos tempos de equilíbrio avaliados. Várias classes de fosfolipídios foram afetadas em blastocistos pela S, FIV e/ou vitrificação de oócitos, e mesmo um curto tempo de exposição às soluções à base de lipídios durante a vitrificação do oócito foram suficientes para induzir alterações no perfil lipídico que foram sustentadas até estágio de blastocisto.

Palavras-chave: Estimulação ovariana. FIV. Vitrificação de oócitos. L-carnitina. Ácidos graxos. Blastocisto. Perfil lipídico.

ABSTRACT

BERTELI, T. S. **The impact of ovarian stimulation, *in vitro* fertilization, oocyte vitrification and supplementation of vitrification media with L-carnitine and fatty acids on the lipid profile of mice oocytes and blastocysts.** 2022. Thesis (Doctorate Degree in Sciences) – Graduated Program in Gynecology and Obstetrics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Objective: We aimed to investigate the effects of equilibration time and the impact of a vitrification medium supplemented with oleic and linoleic fatty acids (FA) and L-carnitine (LC) on embryonic development and on lipid profile of mice oocytes. Additionally, we aimed to analyze the impact of superovulation, *in vitro* fertilization (IVF) and oocyte vitrification on lipid profile of mice blastocysts and the role of LC and FA added to the vitrification media on the lipid profile of blastocysts. **Material and methods:** Experimental study including 936 C57BL/6J mice oocytes randomly divided into fresh IVF (CTR) and equilibration solution groups (ES). Oocytes were exposed to ES of Irvine (IRV), Tvitri-4 (T4) or T4 media supplemented with LC and FA (T4-LC/FA) for 7 or 10 minutes, vitrified-warmed and subjected to IVF. We also evaluated the lipid profile of oocytes immediately after exposure to ES using the same equilibration times. Embryonic development, oocyte lipid profile analysis and lipid pathway analysis were compared between groups. We also compared the lipid profile of blastocysts produced *in vivo* from natural mating cycles (N), produced *in vivo* after superovulation (S) and mating, or produced *in vitro* after superovulation and IVF. For *in vitro* experiments, oocytes were randomly divided into 4 groups: fresh *in vitro* fertilized oocytes and vitrified groups using the previously described vitrification media. Fresh or vitrified/warmed oocytes were inseminated and cultured *in vitro*. Lipid profile of oocytes and blastocysts was evaluated through multiple reaction monitoring profile (MRM profiling) method. **Results:** The longer equilibration time resulted in lower oocyte survival rates and blastocyst formation, reduction of the relative abundance of structural lipids, such as phosphatidylcholines and sphingomyelins, varying according to the ES composition. It also induced the formation of bubbles on the surface of the oocyte predominantly in IRV, rarely in T4 and absent in T4-

LC/FA. In order to reveal the metabolic pathways associated to the equilibration phase of vitrification, lipid pathway analysis was conducted and both p-values and pathway impact values showed that the linoleic acid metabolism ($p=0.00223$; impact =1) and alpha-Linolenic acid metabolism ($p=0.00084$; impact = 0.33) were the most pathway perturbed, followed by glycerophospholipid metabolism ($p=0.0167$; impact = 0.25). Ovarian stimulation alone or associated with IVF promoted an enrichment of saturated phospholipids in blastocysts. Vitrification resulted in a reduced relative abundance of phospholipids and sphingolipids compared to blastocysts generated from fresh IVF oocytes. **Conclusions:** A longer e equilibration phase can influence embryonic development and induce changes in oocyte lipid composition related to membrane integrity. The results suggest the internalization of oleic and linoleic acids added to the ES by the oocyte and, to some extent, seem to contribute to the preservation of membrane phospholipids, regardless of the equilibration times assessed. Several classes of phospholipids were affected in blastocysts by S, IVF and/or oocyte vitrification, and even a short time of exposure to lipid-based solutions during oocyte vitrification was sufficient to induce changes in the lipid profile that sustained until the blastocyst stage

Keywords: Ovarian stimulation. IVF. Oocyte vitrification. L-carnitine. Fatty acids. Blastocyst. Lipid profile.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho experimental para desenvolvimento embrionário (A) e experimentos de perfil lipídico (B).....	35
Figura 2 - Desenho experimental da análise lipídica dos blastocistos.....	37
Figura 3 – Visualização dos oócitos de camundongos C57BL/6 quando expostos à solução de equilíbrio (ES) – tempo total 9 minutos durante protocolo ES10MIN.....	46
Figura 4 - Efeitos de diferentes tempos de equilíbrio e composições ES no perfil lipídico de oócitos.....	48
Figura 5 - Perfil lipídico de oócitos equilibrados em diferentes composições ES por 7 ou 10 minutos.....	49
Figura 6 - Alterações no perfil lipídico em oócitos expostos à solução de equilíbrio por 7 minutos.....	51
Figura 7 - Alterações no perfil lipídico em oócitos expostos à solução de equilíbrio por 10 minutos.....	53
Figura 8 - Perfil lipídico de oócitos expostos a uma solução de equilíbrio padrão (ES) ou ES suplementado com ácidos graxos e L-carnitina (T4-LC/FA).....	54
Figura 9 - Impacto dos tempos de equilíbrio no perfil lipídico do oócito.....	56
Figura 10 - Lípidos de membrana e ácidos graxos livres (AGL) em oócitos equilibrados em IRV por 10 minutos.....	57
Figura 11 –Relação entre a composição ES e o longo tempo de equilíbrio com aparecimento de bolhas na superfície do oócito e distúrbios do perfil lipídico da membrana.....	58
Figura 12 - Análise da via gerada pelo MetaboAnalyst 5.0 usando os lipídios identificados de oócitos expostos à solução de equilíbrio de vitrificação.....	59
Figura 13 - PCA e heat map da análise de agrupamento hierárquico de MRMs selecionados comparando acasalamento natural com (S) e sem superovulação (N), blastocistos produzidos <i>in vitro</i> resultantes de FIV após superovulação (FIV) e de oócitos vitrificados.....	61
Figura 14 - ANOVA, PCA e heat map de análise de agrupamento hierárquico de MRMs selecionados comparando acasalamento natural com (S) e sem superovulação (N), e blastocistos produzidos <i>in vitro</i> resultantes de FIV após superovulação (FIV).....	62

Figura 15 - Análise multivariada por PCA de amostras de blastocisto de ciclos natural (N), superovulado (S) e fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	67
Figura 16 - As 15 principais variáveis PLS-DA de importância para as pontuações de projeção (VIP).....	68
Figura 17 - As 95 principais variáveis PLS-DA de importância para as pontuações de projeção (VIP) entre os grupos de FIV, N e S.....	69
Figura 18 - Comparação do perfil lipídico entre as amostras de blastocisto dos grupos N, S e FIV.....	70
Figura 19 - Análise de MRMs selecionados entre blastocistos produzidos <i>in vivo</i> resultantes de acasalamento natural sem superovulação (N) e acasalamento natural após superovulação (S).....	71
Figura 20 - PCA e Heat map de análise de agrupamento hierárquico de MRMs selecionados comparando o grupo de controle de FIV fresco (FIV) e grupos vitrificados usando meios diferentes (IRV, T4 e T4-LC/ FA).....	72
Figura 21 - As 15 principais variáveis PLS-DA de importância para as pontuações de projeção (VIP) entre os grupos de FIV e vitrificados.....	73
Figura 22 - As 90 principais variáveis PLS-DA de importância para as pontuações de projeção (VIP) entre os grupos FIV e vitrificados.....	74
Figura 23 - Alguns dos lipídios detectados em blastocistos murinos por ANOVA unilateral como discriminante entre controle fresco (FIV) e grupos vitrificados (IRV, T4, T4-LC/FA).	75
Figura 24 - Soma das intensidades relativas de íons nas diferentes classes de lipídeos perfiladas neste estudo para os diferentes grupos (N, S, FIV, IRV, T4 e T4-LC/FA).....	79
Figura 25 - Soma das intensidades relativas de íons nas classes de lipídeos perfiladas neste estudo para os diferentes grupos (N, S, FIV, IRV, T4 e T4-LC/FA) de acordo com o comprimento da cadeia de carbono.....	80
Figura 26 - Análise de ácidos graxos livres entre os grupos N, S, FIV e vitrificados.....	81
Figura 27 - As 25 principais variáveis PLS-DA de importância para as pontuações de projeção (VIP) entre N, S, FIV e grupos vitrificados.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sobrevida oocitária, fertilização, formação de blastocistos (D4) e taxa de formação de blastocistos D5 utilizando oócitos frescos ou vitrificados/aquecidos com meios de vitrificação IRV, T4 e T4-LC/FA.....	44
Tabela 2 - Resultados detalhados da análise de vias, mostrando as vias mais relevantes associadas à fase de equilíbrio da vitrificação.....	60
Tabela 3 - Uma lista completa dos lipídios significativos diferencialmente representados em blastocistos de camundongos produzidos <i>in vivo</i> a partir de ciclos não estimulados (N) ou estimulados (S) e sob estimulação ovariana mais fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	63
Tabela 4 - Lipídios representados diferentemente entre blastocistos de ciclos de FIV (FIV) ou ciclos vitrificados usando meio de vitrificação T4-LC/FA.....	75
Tabela 5 - Lipídios representados de forma diferente entre blastocistos de ciclos de FIV (FIV) ou grupos de ciclos vitrificados usando meio de vitrificação T4.....	76
Tabela 6 - Lipídios representados de forma diferente em blastocistos de ciclos de FIV (FIV) ou grupos de ciclos vitrificados usando meio de vitrificação IRV.....	76

LISTA DE SIGLAS

AG	Ácidos Graxos - Ácidos Oléico e Linoléico
AGL	Ácidos Graxos Livres
AGL	Ácidos Graxos Livres
BRL	Brasil
CA	Califórnia
CDC	Centro de Prevenção e Controle de Doenças
CTR	Controle
D4	Dia 4
D5	Dia 5
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
EOC	Estimulação Ovariana Controlada
ES	Solução de Equilíbrio
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
EUA	Estados Unidos da América
FDR	Taxa Descoberta Falsa
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
GPCRs	Receptores Acoplados a Proteínas G
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
HMDB IDs	The Human Metabolome Database Identifier
IC	Intervalo de Confiança
ICMART	Comitê Internacional de Monitoramento de Tecnologias de Reprodução Assistida
IRV	Irvine Scientific
LC	L-carnitina
Log	Logaritmo
QI	Quartil inferior
QS	Quartil superior
MA	Massachusetts
MI	Michigan

MIN	Minutos
MO	Missori
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
N	Natural
NY	Nova York
PBS	Solução Salina Tampão de Fosfato
PC	Fosfatidilcolina
PCA	Análise de Componentes Principais
PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol
PL	Fosfolipideos
PS	Fosfatidilserina
RR	Risco Relativo
S	Superovulação
SART	Sociedade para Tecnologias de Reprodução Assistida
SHO	Síndrome de Hiperestimulação Ovariana
SM	Esfingomielina
T4	Tvitri-4
T4-LC/FA	Tvitri-4 suplementado com L-carnitina e Ácidos Graxos Oléico e Linoléico
TRA	Tecnologias de Reprodução Assistida
UQ	Quartil superior
VIP	Pontuações de projeção
vs.	Versus

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
x	Vezez
N	Número
° C	Grau Celsius
N ₂	Nitrogênio
<	Menor
>	Maior
g	Gramas
μl	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	Criopreservação de oócitos.....	22
1.2	Importância de antioxidantes e lipídios nos oócitos.....	25
1.3	Modelo experimental murino – Linhagem C57BL/6.....	28
2	JUSTIFICATIVA.....	30
3	OBJETIVOS.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	Reagentes e meios de cultura para fertilização <i>in vitro</i>	33
4.2	Desenho experimental.....	33
4.3	Linhagem de camundongos e manuseio de animais.....	38
4.4	Acasalamento natural.....	38
4.5	Estimulação ovariana e fertilização <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i>	38
4.6	Vitrificação e aquecimento dos oócitos.....	40
4.7	Protocolo de tempo de equilíbrio.....	40
4.8	Preparo das amostras e extração de lipídios.....	41
4.9	Análise de perfil lipídico.....	41
4.10	Análise estatística.....	42
4.11	Pathway analysis.....	42
5	RESULTADOS.....	44
5.1	Fertilização <i>in vitro</i> e desenvolvimento de embriões derivados de oócitos frescos.....	44
5.2	Efeitos do tempo de equilíbrio nas taxas de sobrevivência e resultados de fertilização <i>in vitro</i> de oócitos aquecidos vitrificados.....	44
5.3	Efeitos da composição ES nas taxas de sobrevivência e resultados de fertilização <i>in vitro</i> de oócitos aquecidos vitrificados.....	47
5.4	Efeitos de diferentes tempos de equilíbrio e composições ES no perfil lipídico de oócitos.....	48
5.5	Efeitos da composição ES no perfil lipídico do oócito.....	50
5.6	Efeitos dos tempos de equilíbrio no perfil lipídico do oócito: comparação intra-grupo.....	55
5.7	Relação entre bolhas e perfil lipídico da membrana oocitária.....	57
5.8	Identificação de vias metabólicas envolvidas em oócitos expostos a ES.....	58
5.9	Efeitos de diferentes procedimentos das TRA no perfil lipídico de blastocistos.....	60
5.10	Efeitos da estimulação ovariana e da fertilização <i>in vitro</i> no perfil lipídico de blastocistos.....	62
5.11	Efeitos da vitrificação de oócitos e suplementação de meios de vitrificação no perfil lipídico dos blastocistos oriundos de oócitos aquecidos.....	71

5.12 Perfil lipídico de blastocistos gerados após diferentes procedimentos de TRA de acordo com o comprimento da cadeia ou grau de insaturação de ácidos graxos	78
6 DISCUSSÃO	82
7 CONCLUSÃO.....	92
REFERÊNCIAS	94
ANEXO A	104
ANEXO B	105

1 INTRODUÇÃO

As Tecnologias da Reprodução Assistida (TRA) apresentam demanda crescente nos países desenvolvidos quanto no Brasil. Com base na coleta anual de dados globais de fertilização *in vitro* (FIV) do Comitê Internacional de Monitoramento de Tecnologias de Reprodução Assistida (ICMART), mais de 8 milhões de crianças nasceram em todo o mundo após o uso de TRA (ADAMSON *et al.*, 2018) e mais de 2,5 milhões de ciclos estão sendo realizados a cada ano, resultando em mais de 500.000 partos anuais (FAUSER, 2019). Recentemente, a Sociedade para Tecnologias de Reprodução Assistida (SART) divulgou seus últimos dados nacionais e específicos sobre TRA. O conjunto de dados nacionais preliminares para 2019 mostra 77.256 bebês nascidos resultantes de 302.998 ciclos realizados durante aquele ano, um aumento em relação ao número do ano anterior de 74.590 bebês nascidos de 279.288 ciclos. A preservação da fertilidade para os ciclos autólogos aumentou para 13.275 em 2018, de 9607 em 2017 e 8.825 em 2016 (ASRM, 2021). Com base nos dados preliminares de ciclos de TRA realizados em 2019 publicado pelo Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC); 121.086 foram ciclos em que todos oócitos ou embriões foram congelados para uso futuro (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019).

O processo de fertilização *in vitro* (FIV) compreende três procedimentos principais: (1) estimulação ovariana controlada (EOC), (2) FIV e (3) o cultivo de embriões. Além disso, a criopreservação de oócitos também é um procedimento essencial e rotineiro na reprodução humana assistida.

Dentre as inúmeras indicações clínicas para a criopreservação de oócitos está o intuito de preservar a fertilidade em pacientes que se submeterão a terapias gonadotóxicas para o tratamento de câncer ou outras doenças potencialmente esterilizantes (DE VOS *et al.*, 2014) , para aquelas que respondem limitadamente a terapias de estimulação ovariana (COBO *et al.*, 2012) ou que apresentam risco de desenvolvimento da síndrome de hiperestimulação ovariana (SHO) (HERRERO *et al.*, 2011) e, como forma de garantir a autonomia para mulheres conscientes do declínio na qualidade e quantidade dos oócitos com o avançar da idade materna, que possuam ou não parceiros no momento da preservação eletiva da fertilidade

(ARGYLE *et al.*, 2016).

Políticas de restrição, ou mesmo proibição de criopreservação de embriões, também propiciaram a adoção da prática de criopreservação de oócitos como alternativa. Além disso, a preocupação com os embriões supranumerários faz com que alguns casais prefiram restringir o número destes e criopreservar os oócitos remanescentes dos tratamentos de reprodução assistida (RIENZI *et al.*, 2017).

1.1 Criopreservação de oócitos

A criopreservação trata-se de um procedimento no qual células ou tecidos são mantidos a temperaturas extremamente baixas, como forma de reduzir drasticamente processos metabólicos, possibilitando seu armazenamento durante longos períodos (MANDAWALA *et al.*, 2016).

Por muitos anos, a criopreservação bem-sucedida de oócitos foi um dos desafios dos tratamentos de reprodução assistida visto que o método de congelamento lento (CL) leva à formação de gelo intracelular afetando a taxa de sobrevivência dos oócitos. Desde o primeiro nascimento vivo da criopreservação de oócitos utilizando congelamento lento há três décadas na Austrália (CHEN, 1986), a técnica tornou-se um componente importante das TRA, obtendo avanços significativos nos últimos 20 anos que culminaram na utilização da técnica de vitrificação para substituir o uso do congelamento lento devido ao menor dano às células e maiores taxas de sobrevivência.

Contudo, foi somente em 2013, 14 anos após o primeiro nascido vivo utilizando vitrificação (KULESHOVA *et al.*, 1999), que a técnica deixou de ser considerada experimental e teve seu uso clínico liberado para pacientes em que criopreservar embriões não era possível e que poderiam apresentar declínio expressivo da fertilidade devido a quimioterapia ou outras terapias gonadotóxicas (ASRM *et al.*, 2013). Mais recentemente, a criopreservação planejada de oócitos também foi considerada um procedimento eticamente permissível para auxiliar as mulheres a evitar infertilidade futura devido ao envelhecimento reprodutivo (ASRM, 2018).

De fato, foi somente com o uso da vitrificação que os resultados pós aquecimento

atingiram parâmetros compatíveis com sua aplicação clínica. Isso se deu, devido aos menores danos causados às células e maiores taxas de sobrevivência pós aquecimento comparado ao congelamento lento (RIENZI *et al.*, 2017) levando a resultados clínicos equivalentes aos utilizando oócitos a fresco, para alguns grupos de pacientes (GLUJOVSKY *et al.*, 2014; RIENZI *et al.*, 2017).

Apesar da dificuldade técnica, a criopreservação de oócitos foi um dos grandes avanços das TRA. Como consequência de seu grande tamanho, os oócitos retêm mais água e, portanto, são mais susceptíveis aos danos mediados por cristalização tornando desafiador o processo de criopreservação. Isto se dá devido às características peculiares do oócito: a relação superfície-volume baixa devido ao volume grande, alto teor de água, elevado grau de especialização citoplasmática e sensibilidade da maquinaria de segregação cromossômica (CLARK *et al.*, 2013; COTICCHIO *et al.*, 2007; GARDNER *et al.*, 2007; GOOK *et al.*, 2007; NOTTOLA *et al.*, 2016; VAN BLERKOM *et al.*, 1994). Alguns domínios estruturais dos oócitos maduros em metáfase II (MII) de mamíferos, como a zona pelúcida (ZP), os grânulos corticais (CGs), além de outras organelas, componentes do citoesqueleto e, principalmente, os fusos meióticos são sensíveis ao processo de criopreservação, devido aos efeitos negativos exercidos pelas baixas temperaturas, formação de cristais de gelo intracelular, estresse osmótico e toxicidade das substâncias utilizadas como crioprotetores (COTICCHIO *et al.*, 2010; COTICCHIO *et al.*, 2009; NOTTOLA *et al.*, 2016; NOTTOLA *et al.*, 2008; NOTTOLA *et al.*, 2009; NOTTOLA *et al.*, 2007).

A técnica de vitrificação requer o uso de altas concentrações de crioprotetores, baixo volume e taxas de resfriamento-aquecimento ultrarrápidas de modo a evitar a formação de cristais de gelo intracelular. Durante o processo, as células desidratam osmoticamente em contato com os crioprotetores, e o conteúdo de água intracelular é substituído pelo crioprotetor permeável, atingindo um “estado vítreo”. No processo de aquecimento, as células se reidratam enquanto os crioprotetores são diluídos (COBO *et al.*, 2017).

Os agentes crioprotetores se dividem em duas categorias: os que atravessam a membrana celular, chamados de permeáveis e os que não atravessam a membrana celular chamados não-permeáveis. O dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol (EG), propanodiol (PROH) e glicerol são compostos de baixo peso molecular, se movem facilmente através da membrana das células e reduzem o ponto de congelamento citoplasmático enquanto deslocam

a água intracelular. Os crioprotetores não-permeáveis incluem os compostos como açúcares: mono e dissacarídeos (sacarose, trealose) e algumas macromoléculas que se ligam à membrana plasmática, como albumina sérica humana recombinante ou o hialuronato de sódio. A Albumina, dextrano, ficoll e polivinilpirrolidona só entram lentamente na célula, se é que entram. Sua função nas soluções de criopreservação é a de reduzir ainda mais a água intracelular através da criação de um ambiente extracelular hiperosmótico em relação ao ambiente intracelular. Assim, os crioprotetores extracelulares podem ser utilizados pra controlar a velocidade de desidratação durante o congelamento. Além disso, em soluções de vitrificação, essas moléculas servem para aumentar a viscosidade e a estabilidade do estado vítreo. A fonte de proteína é adicionada para estabilizar ainda mais a membrana. Diferentes kits comerciais para vitrificação estão disponíveis e diferem em relação ao tipo de crioprotetor: EG e/ou DMSO e/ou PROH e sacarose e/ou ficoll e/ou trealose, duração do equilíbrio, aos parâmetros de diluição, os dispositivos empregados (palhetas) e os protocolos de aquecimento. Além disso, a vitrificação é uma técnica manual e, portanto, operador-dependente. Sendo assim, a eficácia da vitrificação pode ser altamente variável e dependente dos protocolos e da experiência do laboratório (CORNET-BARTOLOMÉ *et al.*, 2020).

De fato, sabemos que milhares de bebês nascem a cada ano após a vitrificação de oócitos, e atualmente as taxas de sobrevivida pós-aquecimento de oócitos maduros vitrificados já é alta. Contudo, um estudo publicado avaliando 32.460 oócitos vitrificados, relatou uma taxa de sobrevivida pós aquecimento de 90,4%, traduzindo-se para uma taxa de gravidez clínica de 48% e uma taxa de oócito vitrificado-aquecido para criança nascida viva de apenas 6,5% (COBO *et al.*, 2015). Esta conclusão também foi alcançada recentemente nos resultados do maior estudo comparando a viabilidade de 35.654 oócitos irmãos vitrificados e frescos (CORNET-BARTOLOMÉ *et al.*, 2020; RIENZI *et al.*, 2017). De modo que, mesmo que a vitrificação ocasione menos estresse celular e proporcione resultados superiores quando comparada à técnica de congelamento lento (CIL; BANG; OKTAY, 2013; OKTAY; CIL; BANG, 2006), danos ao gameta feminino não podem ser completamente evitados. Além disso, embora a vitrificação de oócitos represente um dos grandes avanços das TRA por proporcionar taxas de nascidos vivos semelhantes às do uso de oócitos frescos, em alguns grupos de pacientes, a vitrificação é uma técnica recente e a maioria dos estudos relacionados à segurança do método envolvem dados perinatais, neonatais e de curto prazo, com falta de

dados sobre a segurança do método a médio e longo prazo (COBO *et al.*, 2014). Uma vez que o número de bebês nascidos de oócitos vitrificados tem aumentado, a preocupação sobre sua segurança também tem crescido, especialmente em relação aos potenciais efeitos adversos da vitrificação na fisiologia dos oócitos e conseqüentemente de embriões provenientes de oócitos vitrificados.

1.2 Importância de antioxidantes e lipídios nos oócitos

A exposição das células a altas concentrações de crioprotetores e aumento da osmolalidade, bem como a mudanças extremas de temperatura durante a vitrificação podem ter efeitos adversos na fisiologia dos gametas e embriões (GARDNER *et al.*, 2007; SOMOSKOI *et al.*, 2015; TRUONG *et al.*, 2020). Dentre esses efeitos, a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) podem prejudicar as funções celulares e as taxas de sobrevivência (GUPTA *et al.*, 2010; LANE *et al.*, 2002; SOMFAI *et al.*, 2007). Sabe-se que EROs podem modular a sobrevivência celular em baixas concentrações e levar à morte celular em níveis supra-fisiológicos (HALLIWELL, 2006; LEN *et al.*, 2019). As células têm mecanismos para se opor às EROs contudo, uma vez que esses mecanismos estão sobrecarregados, as EROs podem afetar várias funções e processos celulares oxidando proteínas, induzindo danos aos ácidos nucleicos e peroxidação de lipídios (HALLIWELL, 2006; LEN *et al.*, 2019; TEMPLE *et al.*, 2005). A suscetibilidade das células a danos bioquímicos por estresse oxidativo também foi reportada durante o processo de aquecimento (BAUST *et al.*, 2016).

Previamente, Zhang *et al.* demonstrou que o conteúdo lipídico do oócito influencia sua viabilidade após a criopreservação, alterando a integridade da membrana (ZHANG *et al.*, 2012). Diferenças no conteúdo lipídico são observadas não apenas entre as diferentes espécies, mas também em diferentes estágios de desenvolvimento e quando os oócitos são mantidos em diferentes condições, incluindo o processo de criopreservação (BORGES *et al.*, 2019).

É importante lembrar que as membranas celulares não se limitam a barreiras passivas. As propriedades físico-químicas como a viscosidade e permeabilidade regulam a difusão de

solutos para dentro e fora do citosol. A fluidez da membrana é definida com base na concentração e distribuição de vários fosfolipídios e que conseqüentemente podem interferir nas funções das proteínas incorporadas na membrana (VANCE, 2008; VANCE; TASSEVA, 2013). Os lipídios compõem aproximadamente 50% do volume total da membrana plasmática. A fosfatidilcolina, é o fosfolipídio estrutural mais abundante nas membranas celulares de mamíferos, seguido pelas fosfatidiletanolaminas (PE) e pela fosfatidilserina (PS) que representa apenas 2 a 10% dos fosfolipídios totais. Os fosfolipídios de membrana de mamíferos relativamente menores incluem fosfatidilinositol, esfingomiélin e o fosfolipídeo específico da mitocôndria, cardiolipina (VANCE, 2008; VANCE; TASSEVA, 2013). Além das propriedades estruturais da membrana, essas classes lipídicas também estão envolvidas na transdução de sinal na forma de mediadores lipídicos.

A estrutura das caudas de ácidos graxos dos fosfolipídios é fundamental na determinação das propriedades da membrana e quão fluida ela é. Ácidos graxos saturados não tem ligações duplas (são saturadas de hidrogênio e relativamente retas). Os ácidos graxos insaturados contêm mais ligações duplas resultando em curva ou dobra. As caudas se comportam diferentemente de acordo com a temperatura: em temperaturas mais baixas as caudas retas (saturadas) se espremem criando membrana densa e rígida. Já as insaturadas (curvadas) não podem se unir firmemente e em temperaturas baixas ficarão mais fluidas (PELECH *et al.*, 1984; PELECH *et al.*, 1983). Além disso o colesterol localizado nas caudas hidrofóbicas da membrana aumenta fluidez em temperaturas baixas. Alguns estudos utilizando modificadores de metabolismo lipídico sugerem que a alteração da composição da membrana de um oócito poderia alterar a suscetibilidade da célula a baixas temperaturas (ABE *et al.*, 2002; ARCARONS *et al.*, 2017; LEÃO *et al.*, 2015; SANCHES *et al.*, 2013).

Algumas abordagens tem sido sugeridas a fim de minimizar os danos induzidos pelo processo de criopreservação, tais como: 1) aquecimento de oócitos criopreservados a uma taxa "ultrarrápida"; 2) um protocolo de vitrificação "ultrarrápido" (GALLARDO *et al.*, 2019); 3) redução das concentrações de crioprotetor, reduzindo a toxicidade (SEKI *et al.*, 2012); 4) diferentes tempos de exposição à solução de equilíbrio (ES) e solução de vitrificação (VS) (MANJUNATHA *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2011); 5) uso da trealose como crioprotetor não permeante (ISHIDA *et al.*, 1997; SANCHEZ-PARTIDA *et al.*, 2011); e 6) adição de antioxidantes como L-carnitina (MOAWAD *et al.*, 2013; MOAWAD *et al.*,

2014; TRUONG *et al.*, 2020) ou L-carnitina combinada com ácidos graxos (AG) e fosfolipídios à composição do meio de vitrificação (VIANA *et al.*, 2018; VIANA *et al.*, 2019) Patente n. BR102019013697-9).

A L-carnitina (ácido β -gama-hidroxi-butírico-trimetilamônio-LC), é uma pequena molécula solúvel em água que tem atividade antioxidante protegendo as células de danos no citoesqueleto, apoptose embrionária (MANSOUR *et al.*, 2009) e comprometimento da função mitocondrial (DUNNING *et al.*, 2010). Em células animais, o composto de amônio LC também atua como um potencializador do metabolismo lipídico devido ao seu papel principal no transporte de AG do citoplasma para a mitocôndria. Os triacilgliceróis (TG) são metabolizados por lipases das células do cumulus e do oócito e os AG gerados pelo processo são metabolizados por β -oxidação nas mitocôndrias para a produção de adenosina trifosfato (ATP) (DUNNING *et al.*, 2014). O uso de LC exógena para estimular a β -oxidação de ácidos graxos durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos murinos resultou em maiores taxas de desenvolvimento embrionário pós fertilização embora não tenha melhorado a qualidade embrionária conforme refletido pelo número total de células nos blastocistos (PACZKOWSKI *et al.*, 2014). O uso de carnitina ocasionou uma redução do conteúdo lipídico intracelular nos oócitos demonstrando que seu uso aumentou a utilização dos estoques de ácidos graxos intracelulares (PACZKOWSKI *et al.*, 2014). A suplementação com LC foi também associada a melhora da atividade mitocondrial, redução do conteúdo de lipídios intracelulares e níveis de EROs, aumento da maturação oocitária e clivagem em embriões provenientes oócitos porcinos submetidos a MIV (SOMFAI *et al.*, 2011).

O conteúdo lipídico em oócitos e embriões parece ser espécie-específico e os camundongos parecem ter a menor abundância de lipídios em comparação com outros animais (LOEWENSTEIN *et al.*, 1964). Devido à sua natureza hidrofóbica, os lipídios são os principais constituintes das membranas biológicas e, portanto, podem ser considerados a base de todos os organismos vivos (ZÜLLIG *et al.*, 2020). Independentemente das espécies de oócitos e embriões, existem semelhanças estruturais lipídicas subjacentes evidentes nos perfis de espectrometria de massa (MS), como a alta abundância de fosfatidilcolina PC 34:1, comumente composta de ácidos palmítico (16:0) e oléico (18:1), que formam a bicamada lipídica de toda a membrana.

Diferenças na abundância de ésteres de colesterol, ácidos graxos livres (AGL),

fosfatidilcolina e esfingomiéline de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* e *in vivo* também foram descritas (ANNES *et al.*, 2019; GONZÁLEZ-SERRANO *et al.*, 2013), com maior abundância nos últimos. Outros estudos ligaram procedimentos reprodutivos, como estimulação ovariana a alterações no metabolismo lipídico de oócitos e embriões de camundongos (WANG *et al.*, 2015), e o procedimento de fertilização *in vitro* também foi relatado alterar os perfis de fosfolipídios na placenta de camundongos (CHEN, 1986).

Considerando características específicas dos oócitos como o tamanho e sua relação com os processos de desidratação e reidratação, e também a permeabilidade da membrana (Smith *et al.*, 2011), melhorias nos meios de vitrificação deveriam levar em conta a importância de proteger a bicamada lipídica da membrana. Além disso, uma vez que os lipídios desempenham um papel crucial em muitos processos biológicos, qualquer desequilíbrio em sua homeostase poderia levar a problemas graves nos organismos vivos. Portanto, estudos que investiguem a composição lipídica, especialmente lipídios relacionados à bicamada lipídica da membrana, podem ser úteis para avaliar se diferentes etapas das TRA podem levar a alterações do perfil lipídico e se a adição de antioxidantes e AG ao meio de vitrificação poderia ter um efeito protetor contra o dano oxidativo induzido pelo processo de criopreservação durante os tratamentos de reprodução assistida (VIANA *et al.*, 2018). Neste estudo, nós empregamos um método analítico poderoso e sensível para detecção de biomoléculas em concentrações extremamente baixas como picomoles para monitorar alterações na composição lipídica da membrana oocitária caracterizada por uma abundância relativa aumentada ou reduzida de fosfolipídios, ácidos graxos livres e outras classes de lipídios que é o método abrangente chamado perfil MRM (de Lima *et al.*, 2018).

1.3 Modelo experimental murino – Linhagem C57BL/6

Ainda não existe um modelo considerado ideal para o estudo do desenvolvimento humano, porém, os murinos são tradicionalmente modelos experimentais largamente utilizados por sua maior disponibilidade, fácil manejo, menor tempo de gestação e, principalmente, por apresentar homologia metabólica com o embrião humano (CHORILLI *et al.*, 2007). A partir da análise comparativa preliminar do genoma humano e murino foi

confirmado que esses animais são os melhores modelos para estudos de regulação e controle de desenvolvimento embrionário em nível molecular, tornando-se um bom modelo translacional para estudos pré-clínicos em humanos (BAUMANN *et al.*, 2007). Além disso, a baixa competência de desenvolvimento dos oócitos C57BL/6 pode ser um modelo melhor para seres humanos nos quais a qualidade dos oócitos é comprometida pelo envelhecimento ou condições patológicas, como diabetes e obesidade, por exemplo (ARGYLE *et al.*, 2016; MOAWAD *et al.*, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

A criopreservação de oócitos tem sido amplamente utilizada como uma ferramenta importante para mulheres submetidas a técnicas de reprodução assistida para o tratamento da infertilidade e como estratégia na tentativa de manter o potencial de fertilidade futura por razões sociais ou médicas.

Por um lado, atualmente, a vitrificação de oócitos já se mostra efetiva por proporcionar taxas de nascidos vivos semelhantes às do uso de oócitos frescos, em alguns grupos de pacientes. Todavia, por outro lado, a vitrificação é uma técnica recente e a maioria dos estudos relacionados à segurança do método envolve dados perinatais, neonatais e de curto prazo, com falta de dados sobre a segurança do método a médio e longo prazo (COBO *et al.*, 2014), de modo que a segurança deste procedimento precisa ser melhor investigada. Neste contexto, estudos utilizando modelos animais são importantes, tanto para investigar a segurança das metodologias utilizadas nos procedimentos de reprodução assistida, como para avaliar abordagens passíveis de minimizar os danos ocasionados pelo processo de vitrificação.

Estudos previamente realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram, pela primeira vez, que a presença de ácidos graxos insaturados e L-carnitina em meio de vitrificação foi associada a melhora no número de células da massa celular interna (MCI) nos blastocistos (VIANA *et al.*, 2018) indicando o potencial desta estratégia para melhorar a qualidade embrionária e os resultados da vitrificação. Outros estudos do grupo mostraram melhora na viabilidade de espermatozoides humanos criopreservados em meio totalmente sintético, com formulação à base de fosfatidilcolina (PC) com alto grau de pureza. Adicionalmente, a permeabilidade e a resistência à toxicidade crioprotetora e/ou estresse osmótico durante a exposição mais longa a solução de equilíbrio são particularmente relevantes e conforme relatado em um estudo retrospectivo incluindo 192 blastocistos de 167 pacientes, a exposição prolongada a soluções de equilíbrio na vitrificação de blastocistos humanos pode ser prejudicial ao potencial de desenvolvimento do embrião, ao passo que uma exposição mais curta pode afetar a penetração de crioprotetores nos blastômeros (KUWAYAMA *et al.*, 2005; MITSUHATA *et al.*, 2020). Além disso, atualmente, não existe um protocolo universal de vitrificação de oócitos humanos. É uma prática comum colocar oócitos em solução de equilíbrio (ES) com tempos de exposição variando de 10 a 15 minutos de acordo com as recomendações dos fabricantes, e que diferem entre os estudos (COBO *et al.*, 2008; KUWAYAMA *et al.*, 2005; MAGNUSSON *et al.*, 2008).

Neste contexto, testamos a hipótese de que protocolos de equilíbrio longos são mais propensos a induzir distúrbios da membrana do oócito exposto a meios de vitrificação padrão e que as moléculas de lipídios podem ser incorporadas às membranas do oócito durante a exposição a soluções de vitrificação e modular seu perfil lipídico. Para isso, avaliamos o impacto de dois diferentes tempos de duração de equilíbrio e composições distintas do meio de vitrificação no perfil lipídico da membrana de oócitos e nas taxas de desenvolvimento embrionário utilizando o modelo experimental murino. Adicionalmente analisamos a introdução de espécies lipídicas combinadas a antioxidante em soluções crioprotetoras durante o protocolo de vitrificação adotando um protocolo curto de exposição à solução ES como estratégia para aumentar a criotolerância e minimizar danos aos oócitos por meio da incorporação de lipídios à membrana celular e/ou modificação do metabolismo lipídico. Também avaliamos se diferentes etapas das TRA (estimulação ovariana, fertilização *in vitro* e vitrificação de oócitos) poderiam levar a alterações do perfil lipídico de blastocistos murinos e se a adição de LC e AG ao meio de vitrificação poderia ter um efeito protetor contra o dano oxidativo minimizando os potenciais efeitos deletérios da técnica de vitrificação.

3 OBJETIVOS

I - Comparar os resultados de desenvolvimento embrionário provenientes de oócitos vitrificados e aquecidos utilizando dois tempos de equilíbrio (ES-7MIN) ou (ES-10MIN), durante o protocolo de vitrificação e três kits de vitrificação/aquecimento com diferentes formulações: a) Irvine Scientific (IRV), um meio de vitrificação padrão comercial; b) Tvitri-4 (T4) - Invitra® (Ribeirão Preto, SP, Brasil) e c) Tvitri-4 suplementado com L-carnitina (LC) e ácidos graxos oleico e linoléico (FA) - T4-LC/FA.

II - Avaliar se a duração do tempo de exposição dos oócitos às soluções de equilíbrio (ES-7MIN ou ES-10MIN) durante o protocolo de vitrificação e se as composições das mesmas interferem no perfil lipídico oocitário.

III - Avaliar o impacto da estimulação ovariana, da FIV e da vitrificação de oócitos utilizando os três kits de vitrificação/aquecimento acima descritos sobre o perfil lipídico dos blastocistos e abordar o papel da LC e ácidos graxos adicionados ao meio de vitrificação utilizando o protocolo curto de exposição a ES (ES-7MIN) no perfil lipídico dos blastocistos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes e meios de cultura para fertilização *in vitro*

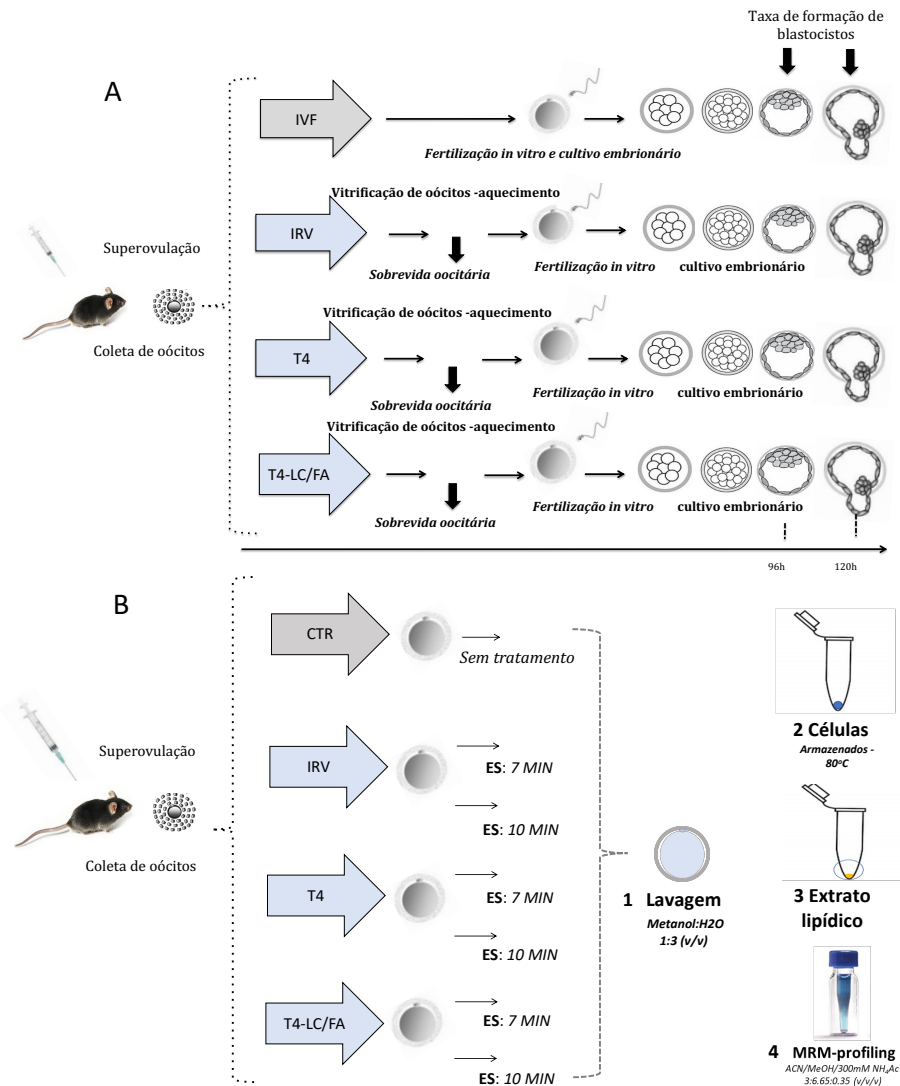
Todos os meios de cultura e reagentes foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA), exceto onde indicado de outra forma. A solução salina tampão de fosfato (PBS) foi adquirida da Gibco/BRL (Grand Island, NY, EUA). O metanol (ACS/HPLC) foi adquirido da Burdick & Jackson (Muskegon, MI, EUA). Água ultrapura, purificada pelo sistema de água Direct-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA), foi utilizada para a preparação dos solventes.

4.2 Desenho experimental

Em primeiro lugar, analisamos o desenvolvimento embrionário de oócitos vitrificados /aquecidos expostos a ES por 7 ou 10 minutos em diferentes soluções de vitrificação e aquecimento. A duração da fase de equilíbrio de pré-vitrificação seguiu o tempo mínimo estabelecido pelo protocolo do fabricante (10 minutos) e é aqui referido como protocolo de equilíbrio longo (ES-10MIN). O tempo de exposição ao ES por 7 minutos (ES-7MIN) consistiu em um protocolo otimizado de nosso laboratório de acordo com a aparência morfológica do oócito nos minutos finais de exposição ao ES. Os oócitos desnudados (n = 936; 10 replicatas) foram divididos aleatoriamente em grupo de controle de FIV (CTR) ou grupos vitrificados e expostos a ES7-7MIN (n = 562; 4 replicatas) ou ES-10MIN (n = 374; 6 replicatas) utilizando três meios de vitrificação diferentes: 1) Irvine Scientific (IRV) (Santa Ana, CA, EUA), um meio de vitrificação padrão disponível no mercado; 2) Tvitri-4 (T4) com (ES): 7.5% v/v DMSO e 7.5% v/v EG) e (VS; 15% v/v DMSO, 15% v/v EG e 0.3 M trealose), gentamicina, suplemento protéico e adição de dois aminoácidos (AA). A solução de diluição (DS) preparada com meio base suplementado com 0.3M trealose e AA e, a solução de lavagem com meio base suplementado com 0.15M ou 0.0M de trealose, respectivamente, e AA - Invitra® (Ribeirão Preto, SP, Brazil), e 3) Tvitri-4 contendo a base previamente descrita suplementado com L-carnitina e ácidos graxos oléico e linoléico (T4-LC/FA; Patente nº BR102019013697-9), e as taxas de desenvolvimento embrionário foram analisadas (Figura 1-A). Em segundo lugar, avaliamos os efeitos dos mesmos tempos de equilíbrio no perfil

lipídico do oócito imediatamente após a exposição à etapa de equilíbrio, utilizando os meios IRV, T4 e T4-LC/FA (3 replicatas; n = 20 oócitos/grupo) (Figura 1-B). Portanto, 6 grupos experimentais e 1 controle foram incluídos no estudo experimental. Durante os experimentos, a embriologista responsável pelos experimentos foi cegada para o meio de vitrificação utilizado. Todos os procedimentos de FIV foram realizados no Laboratório Experimental de FIV do Setor de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP). A produção dos meios de vitrificação Tvitri-4 e T4-LC/FA e a extração de lipídios do oócito foram realizadas no laboratório da Invitra, e a análise de lipídios por ESI-MS realizada no Bindley Bioscience Mass Spectrometry Facility da Purdue University/EUA.

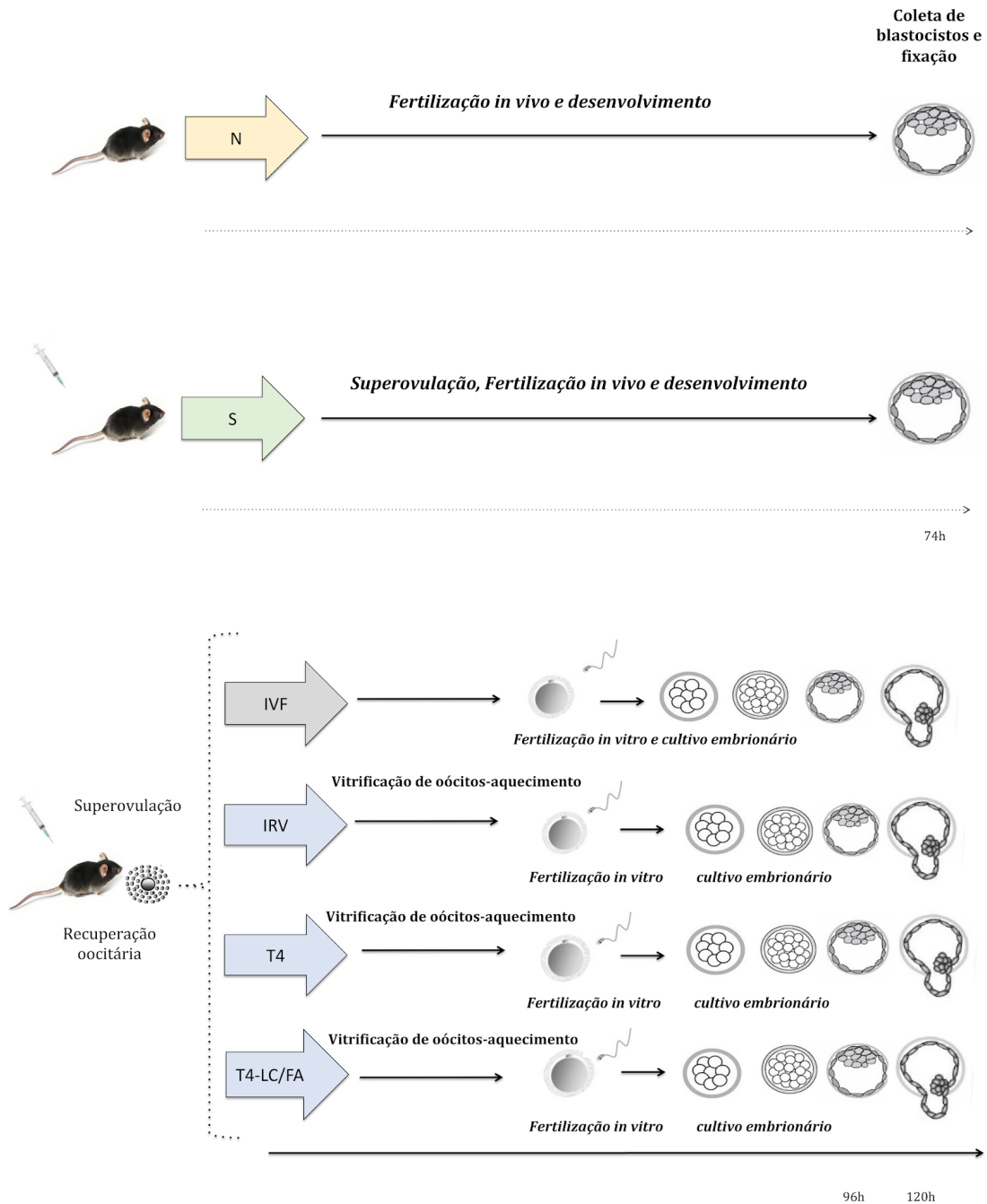
Figura 1 - Desenho experimental para desenvolvimento embrionário e experimentos de perfil lipídico.



Nota: Desenho experimental para desenvolvimento embrionário (A) e experimentos de perfil lipídico (B). (A) Camundongos fêmeas foram estimuladas (eCG, HCG), e os oócitos foram coletados e divididos aleatoriamente em grupos FIV fresco, IRV, T4 e T4-LC/FA. A categoria FIV fresco compreende o procedimento de fertilização *in vitro* que incorpora superovulação seguida de recuperação de oócitos, FIV e cultura de embriões. Os grupos IRV, T4 e T4-LC/FA incluíram superovulação, recuperação de oócitos mais vitrificação/aquecimento de oócitos, FIV e cultivo de embriões. Ao longo de 10 repetições, os oócitos foram vitrificados utilizando dois tempos de exposição diferentes a ES: 10 minutos (ES-10MIN) ou 7 minutos (ES-7MIN). (B) Seis grupos de estudos foram definidos. Camundongos fêmeas foram superovulados e os oócitos foram coletados e divididos aleatoriamente entre os grupos controle (CTR) e ES (IRV, T4 e T4-LC/FA). No grupo CTR, os oócitos não foram expostos ao ES. No IRV, T4 e T4-LC/FA os oócitos foram expostos aos mesmos tempos de equilíbrio (7 ou 10 minutos), lavados em metanol: H₂O solução 1: 3 (v/v), armazenados a -80°C, submetidos a extração de lipídios e, em seguida, analisada por espectrometria de massa usando a abordagem de perfilagem por *MRM*.

Posteriormente, para investigar como diferentes procedimentos de reprodução assistida afetam o perfil lipídico de blastocistos de camundongo, seis grupos experimentais foram estabelecidos: 1) Ciclo natural: blastocistos produzidos *in vivo* a partir de acasalamento natural (N); 2) Estimulação ovariana: blastocistos produzidos *in vivo* após superovulação (S) e acasalamento; Fertilização *in vitro*: blastocistos produzidos *in vitro* após superovulação e FIV de oócitos frescos (3) grupo FIV) ou superovulação e vitrificação/aquecimento oocitário usando: 4) IRV, 5) T4 e 6) T4-LC/FA (Figura 2). Também avaliamos os efeitos da suplementação do meio de vitrificação de oócitos com antioxidantes e AG insaturados no perfil lipídico dos embriões, comparando blastocistos de oócitos frescos vs. vitrificados e blastocistos de oócitos suplementados durante o processo de vitrificação (T4-LC/FA) com dois controles apresentando o mesmo meio base (T4) ou uma formulação distinta (IRV).

Figura 2 - Desenho experimental da análise lipídica dos blastocistos.



Nota: Desenho experimental: Seis grupos foram definidos de acordo com o tipo de concepção. O Grupo N é o grupo controle, naturalmente concebido. O grupo S representa os embriões derivados de oócitos oriundos de ciclos estimulados por hormônios (eCG, HCG), que sofreram fertilização natural e desenvolvimento *in vivo*. Para os grupos *in vitro*, as fêmeas foram estimuladas e os oócitos coletados e divididos aleatoriamente entre os grupos FIV (controle), IRV, T4 e T4-LC/FA. O grupo FIV é o grupo de fertilização *in vitro* que inclui superovulação mais coleta de oócitos, FIV e cultivo de embriões. Os grupos IRV, T4 e T4-LC/FA incluíram superovulação, coleta de oócitos mais vitrificação/aquecimento de oócitos utilizando o protocolo 7 minutos de exposição a ES (ES-7MIN), FIV e cultivo de embriões. Os embriões foram coletados no estágio de blastocisto em todos os seis grupos experimentais.

4.3 Linhagem de camundongos e manuseio de animais

Fêmeas C57BL/6J foram utilizadas com 8 semanas de idade e machos C57BL/6J com fertilidade confirmada (DUTTA *et al.*, 2016). Os animais foram mantidos no Biotério da Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo antes dos experimentos. Durante esse período, os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura controlada e com ração e água *ad libitum*, conforme orientação de cuidados com os animais. A autorização de ética foi concedida pelo Comitê de Ética para o uso de animais sob o número (CEUA-FMRP/USP-107/2017) conforme Anexo A.

4.4 Acasalamento natural

Camundongos machos foram acasalados durante uma noite com uma fêmea (estro positivo) e tampões vaginais foram registrados cerca de 12h após o coito. A eutanásia foi realizada por deslocamento cervical conforme aprovado pelo Comitê de Ética para uso de animais desta Universidade e os blastocistos foram coletados por flushing uterino aproximadamente 74h depois do coito com meio Embryomax M2 (Millipore sigma). Os blastocistos foram lavados 3-5 vezes em solução de metanol: H₂O (1: 3 v/v) para retirada completa dos meios e mantidos a -80°C até a extração dos lipídios.

4.5 Estimulação ovariana e fertilização *in vivo* ou *in vitro*

Camundongos fêmeas foram injetados intraperitonealmente com 5 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Novormon - Syntex SA - Buenos Aires, Argentina) seguido por 5 UI de gonadotrofina coriônica humana (HCG; Chorulon - Syntex SA, Buenos Aires, Argentina), 48 horas mais tarde. Camundongos machos foram acasalados durante uma noite com uma fêmea que foi posteriormente sacrificada para coleta e fixação de blastocistos, conforme descrito anteriormente. Para investigar o efeito da superovulação seguida de fertilização *in vitro* (grupo FIV), os epidídimos foram isolados, lavados em meio M2 e puncionados utilizando uma pinça cirúrgica de forma a esgotar o conteúdo de espermatozoides dos epidídimos e transferi-los para gotas de 100 µl de meio caseiro HTF, capacitando-os por 1-2 h a 37°C, 5% de CO₂ em meio caseiro HTF. Simultaneamente, complexos cúmulos-oócitos (COCs) foram liberados dos ovidutos de fêmeas superovuladas

usando meio tamponado M2 e imediatamente transferidos para outra placa com meio caseiro HTF pré-equilibrado coberto por óleo mineral (Irvine Scientific) a 37°C, 5% de CO₂. Os COCs foram desnudados com a enzima hialuronidase (Irvine Scientific) por no máximo 30 segundos e posteriormente submetidos a uma denudação mecânica com capilares (stripper tips) de diferentes calibres (Cook Medical). Os oócitos desnudados foram divididos aleatoriamente entre o grupo de FIV fresco e para os três grupos utilizando oócitos vitrificados (IRV, T4 e T4-LC/FA). O processo de criopreservação reduz a fertilidade dos oócitos, principalmente devido ao endurecimento crio-induzido da zona pelúcida (CARROLL *et al.*, 1990; ISHIZUKA *et al.*, 2014; MATSON *et al.*, 1997) e devido à capacitação incompleta dos espermatozóides na ausência das células do cúmulus circundantes (CARROLL *et al.*, 1990; ENDOH *et al.*, 2007; VINCENT *et al.*, 1990). De modo que, para superar essas limitações e devido a inexistência de equipamento de ICSI no nosso laboratório experimental, no presente estudo, realizamos a técnica de dissecação parcial da zona parcial da zona pelúcida (PZD) nos oócitos, conforme descrito anteriormente por Nakagata *et al.* (NAKAGATA *et al.*, 1997). Essa técnica foi primeiramente descrita em 1989 por Malter e colaboradores antes do advento da ICSI. Mais tarde em 1997, Naomi Nakagata publicou uma adaptação da técnica utilizando agulhas de 26G conforme consta no Manual Técnico de técnicas de engenharia reprodutiva em camundongos (NAKAGATA *et al.*, 1997). A fim de evitar viés entre os grupos, PZD também foi realizado no grupo de fertilização *in vitro* fresco. Após a capacitação, os oócitos desnudados foram inseminados com 10 µl da suspensão de espermatozóides pós capacitação por 3 h a 37°C, 5% CO₂ em CARD MEDIUM (HTF caseiro mais glutathione reduzida, GSH - Sigma 4251). Após as 3h de incubação, os oócitos foram lavados para retirada dos espermatozoides em meio caseiro HTF e cultivados por 96 ou 120h em meio de cultivo contínuo (KSOM, Cosmo bio co., LTD), incubados a 37°C com 5% de CO₂. Para evitar perturbações no cultivo de embriões, a incubadora de CO₂ só foi aberta no dia 4. Portanto, embriões com duas células ou mais em D4 foram utilizados para estimar as taxas de fertilização. As taxas de formação de blastocistos foram calculadas em D4 (96 h pós-inseminação) e D4 + D5 (120 h pós-inseminação) dividindo o número de blastocistos pelo número de oócitos fertilizados multiplicado por 100. Para análise lipídica os blastocistos foram fixados e armazenados conforme descrito anteriormente.

4.6 Vitrificação e aquecimento dos oócitos

Oócitos dos grupos IRV, T4 e T4-LC/FA foram mantidos por 1 minuto em meio caseiro HTF e, em seguida, unidos na primeira gota de 20 μ l ES e mantidos por 2 minutos, e então unidos em uma segunda gota de 20 μ l de ES e mantidos por 2 minutos à temperatura ambiente. Por fim, transferidos para a terceira gota de 20 μ l ES e mantidos por 3 ou 6 minutos totalizando 7 ou 10 minutos de exposição ao ES. Após o equilíbrio, os oócitos foram transferidos para uma gota de 50 μ l de VS e mantidos por 1 minuto em temperatura ambiente, sendo então depositados em palhetas de Cryo-Ingá (Ingamed, Maringá, PR, Brasil) e imersos em nitrogênio líquido (N₂). Embora três meios de vitrificação diferentes tenham sido usados, o mesmo protocolo (Irvine Scientific) foi adotado para todos. Após 2–4 semanas, os oócitos foram aquecidos. Para o aquecimento, as palhetas de vitrificação foram rapidamente imersas em solução de aquecimento (TS) em gota de 250 μ l, a 37°C, por 1 minuto. Em seguida, os oócitos foram transferidos para uma gota de 50 μ l de solução de diluição (DS) por 4 minutos e sequencialmente para duas gotas de 25 μ l solução de lavagem (WS) em temperatura ambiente. O tempo de exposição no WS variou em paralelo com a duração do protocolo de vitrificação, de acordo com as instruções do fabricante. Portanto, os oócitos dos grupos ES-7MIN e ES-10MIN foram mantidos em WS por 6 ou 8 minutos, respectivamente. Neste experimento, todas as soluções de vitrificação (ES e VS) e soluções de aquecimento (TS, DS e WS) do meio T4-LC/FA foram suplementadas com L-carnitina mais ácidos graxos oleico e linoléico. As taxas de sobrevivência do oócito foram indicadas pela ausência de citoplasma escurecido ou por membranas rompidas ou zona pelúcida indicando degeneração. Imediatamente após o aquecimento, os oócitos foram mantidos na incubadora, em meio HTF caseiro pré-equilibrado coberto com óleo mineral. O PZD foi realizado após o aquecimento do oócito e a capacitação espermática e fertilização *in vitro* foram realizadas conforme descrito anteriormente. Os experimentos a fresco foram realizados em dias diferentes dos procedimentos a fresco, sendo assim, cada replicata de experimentos utilizando oócitos a fresco ou vitrificados-aquecidos utilizou um macho diferente.

4.7 Protocolo de tempo de equilíbrio

Os oócitos de camundongo foram coletados após superovulação e expostos a ES em meio IRV, T4 ou T4-LC/FA por 7 ou 10 minutos. Os oócitos dos grupos CTR e dos tempos

de equilíbrio não foram expostos ao VS nem às soluções de aquecimento. Na etapa final de equilíbrio, os oócitos foram lavados 3 a 5 vezes em gotas de 50 µl de solução de metanol: H₂O (1:3 v/v) para remover o meio de vitrificação e fixados em solução de 2 µl metanol: H₂O (1:3 v/v) e mantidos a -80°C até a extração lipídica. No grupo de controle fresco, os oócitos foram fixados sem exposição ao ES (Figura 1-B).

4.8 Preparo das amostras e extração de lipídios

As amostras de blastocistos individuais de cada grupo ou pool de oócitos foram lavadas 3-5 vezes em metanol/água conforme descrito anteriormente. Após a lavagem, foram fixadas em 2 µl de metanol/água e armazenadas em microtubos (ependorfs) em freezer a -80°C até a extração dos lipídios. Os lipídios foram extraídos individualmente utilizando o protocolo de metanol em uma etapa, adicionando 10 µl de metanol puro na parte inferior do microtubo, evitando a degradação da amostra (n=20 oócitos/grupo – 3 replicatas experimentais) ou (n=9 blastocistos/grupo - 3 replicatas experimentais). Antes de iniciar a extração lipídica, foi confirmada a presença do blastocisto ou pool de oócitos no fundo do microtubo/ependorf utilizando um estereomicroscópio. Após 1 hora, o processo de evaporação do solvente foi avaliado. Quando ocorreu a evaporação completa do solvente, o empacotamento a vácuo foi realizado. As amostras foram mantidas a -30°C até o término da extração de todas as amostras. Após finalizadas as extrações as amostras foram enviadas para Purdue –IN (USA) para análise lipídica.

4.9 Análise de perfil lipídico

As amostras contendo os extratos lipídicos foram injetadas em fluxo no espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo equipado com uma fonte de íons de eletrospray (ESI-MS). Os lipídios foram analisados pelo método MRM-profiling (DE LIMA *et al.*, 2018), e os valores das intensidades relativas dos íons detectados em cada grupo foram comparados. Uma lista de 125 MRMs com intensidade de íons acima do branco da extração foi selecionada e usada para interrogar as amostras de cada grupo experimental de blastocistos. Uma lista de 187 MRMs com intensidade de íons acima das observadas na extração em branco foi selecionada e usada para interrogar as amostras de cada grupo experimental de oócitos.

4.10 Análise estatística

Para a análise do perfil lipídico, os valores das intensidades relativas dos íons foram avaliados usando análise univariada (One-way ANOVA, fold change, teste t e Vulcano plot) e análise multivariada (PCA e PLS-DA). As espécies de lipídios mais informativas em cada grupo foram classificadas utilizando a análise PLS-DA e variáveis de importância – VIP scores (VIP>1). Além disso, analisamos cada classe de lipídio/metabólito separadamente. Para isso, a soma das abundâncias relativas dos lipídios presentes nas amostras foi feita a fim de investigar o padrão de distribuição dos lipídios entre os grupos estudados para cada classe de lipídios quando classificados por comprimento de cadeia ou nível de saturação. O comprimento da cadeia refere-se ao número de átomos de carbono na estrutura molecular do lipídio. Sendo assim foi classificado entre “mais curto”, “médio” e “mais longo” de acordo com as espécies de lipídios perfiladas. Os níveis de saturação referem-se à presença de ligações duplas entre os átomos de carbono e podem variar de 0 (saturado), 1 ou 2 (insaturado) e 3 ou mais (poliinsaturado). Com relação às taxas de sobrevivência oocitária, fertilização e formação de blastocistos, uma análise exploratória dos dados foi realizada utilizando frequências absolutas e relativas seguidas de análise relativa de risco (RR). Na análise RR, as comparações entre grupos incluíram a) grupos de vitrificação vs. CTR como referência (oócitos frescos); b) Grupos Tvitri-4 vs. IRV como referência; c) T4-LC/FA vs. T4 como referência. As comparações intra-grupo foram realizadas entre os protocolos ES-7MIN e ES-10MIN dentro de cada grupo de vitrificação. O risco relativo seguido do intervalo de confiança foi estimado para quantificar a possível associação entre os grupos. Foi considerado estatisticamente relevante quando o intervalo de confiança não continha o valor 1. Os testes foram realizados no programa SAS versão 9.4.

4.11 Pathway analysis

Os lipídios selecionados (HMDB IDs) foram analisados com o módulo Pathway Analysis do MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/> [acessado em maio de 2021]). O módulo Pathway Analysis combinou os resultados de uma poderosa análise de enriquecimento de vias com a análise de topologia de vias para ajudar a identificar as vias mais relevantes envolvidas nas condições sob este estudo. Ele usa caminhos metabólicos KEGG de alta qualidade como base de conhecimento (XIA *et al.*, 2015). Usando

os lipídios significativos de oócitos expostos à solução de equilíbrio da vitrificação e apresentando bolhas, geramos a análise das vias. Este módulo foi utilizado com as bibliotecas de KEGG de camundongos, o teste hipergeométrico e a opção de centralidade de intermediação relativa para análise topológica.

5 RESULTADOS

5.1 Fertilização *in vitro* e desenvolvimento de embriões derivados de oócitos frescos

De 10 repetições de experimentos de fertilização *in vitro* realizados com oócitos frescos (grupo CTR), foi obtida uma taxa de fertilização geral de 90,52% (IC 95%: 85,19-95,85). Com relação ao desenvolvimento embrionário, a taxa de formação de blastocistos em D4 foi de 61,90% (IC 95%: 52,62-71,19), enquanto a taxa cumulativa de blastocistos (D4 mais D5) atingiu 76,19% (IC 95%: 68,04-84,34).

5.2 Efeitos do tempo de equilíbrio nas taxas de sobrevivência e resultados de fertilização *in vitro* de oócitos aquecidos vitrificados

Os resultados da comparação intra grupo mostraram-se aproximadamente 20% menores após o equilíbrio em ES-10MIN em comparação com ES-7MIN, independentemente do meio de vitrificação: IRV (RR: 1,27, IC 95%: 1,09-1,47); T4 (RR: 1,35, IC 95%: 1,16-1,57) e T4-LC/FA (RR: 1,20, IC 95%: 1,05-1,37) (Tabela 1).

Tabela 1 - Sobrevida oocitária, fertilização, formação de blastocistos (D4) e taxa cumulativa de formação de blastocistos D4+D5 utilizando oócitos frescos ou vitrificados/aquecidos com meios de vitrificação IRV, T4 e T4-LC/FA.

	Grupo	Sobrevida oocitária (N)			N	IC95%					
		Não	Sim	Percentagem %		RR	QI	QS			
ES7MIN	IRV	2	46	95.83	48	ref	ref	ref	-	-	-
	T4	1	47	97.92	48	1.02	0.95	1.10	-	-	-
	T4-LC/FA	2	46	95.83	48	1.00	0.92	1.09	-	-	-
ES10MIN	IRV	17	52	75.36	69	ref	ref	ref	-	-	-
	T4	19	50	72.46	69	0.96	0.79	1.17	-	-	-
	T4-LC/FA	14	55	9.71	69	1.06	0.88	1.27	-	-	-

(continua)

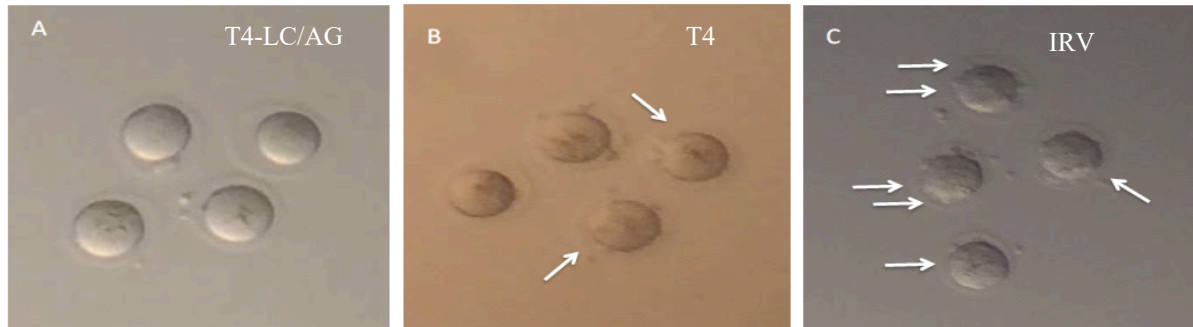
		Fertilização (N)			IC95%				IC95%		
	Grupo	Não	Sim	(%)	N	RR	QI	QS	RR	QI	QS
ES7MIN	CTR	11	105	90.52	116	ref	ref	ref	-	-	-
	IRV	5	26	83.87	31	0.93	0.78	1.09	ref	ref	ref
	T4	8	32	80.00	40	0.88	0.75	1.04	0.95	0.77	1.19
	T4-LC/FA	5	33	86.84	38	0.96	0.84	1.10	1.03	0.85	1.26
ES10MIN	CTR	11	105	90.50	116	ref	ref	ref	-	-	-
	IRV	11	32	74.41	43	0.82	0.68	0.99	ref	ref	ref
	T4	12	32	72.73	44	0.80	0.66	0.97	0.98	0.76	1.26
	T4-LC/FA	10	37	78.72	47	0.87	0.74	1.02	1.06	0.84	1.33
		Blastocistos D4 (N)			IC95%				IC95%		
	Grupo	Não	Sim	(%)	N	RR	QI	QS	RR	QI	QS
ES7MIN	CTR	40	65	61.90	105	ref	ref	ref	-	-	-
	IRV	17	9	34.61	26	0.56	0.32	0.97	ref	ref	ref
	T4	24	8	25.00	32	0.40	0.22	0.75	0.72	0.32	1.61
	T4-LC/FA	22	11	33.33	33	0.54	0.32	0.89	0.96	0.47	1.97
ES10MIN	CTR	40	65	61.90	105	ref	ref	ref	-	-	-
	IRV	29	3	9.38	32	0.15	0.05	0.45	ref	ref	ref
	T4	26	6	18.75	32	0.30	0.14	0.63	2.00	0.55	7.31
	T4-LC/FA	30	7	18.92	37	0.31	0.15	0.60	2.02	0.57	7.16
		Blastocistos D4+D5 (N)			IC95%				IC95%		
	Grupo	Não	Sim	(%)	N	RR	QI	QS	RR	QI	QS
ES7MIN	CTR	25	80	76.19	105	ref	ref	ref	-	-	-
	IRV	10	16	61.54	26	0.81	0.58	1.115	ref	ref	ref
	T4	6	26	78.12	32	1.02	0.83	1.27	1.27	0.89	1.81
	T4-LC/FA	19	14	42.42	33	0.56	0.37	0.84	0.689	0.42	1.14
ES10MIN	CTR	25	80	76.19	105	ref	ref	ref	-	-	-
	IRV	21	11	34.37	32	0.45	0.28	0.74	ref	ref	ref
	T4	16	16	50.00	32	0.66	0.46	0.94	1.45	0.81	2.63
	T4-LC/FA	17	20	54.05	37	0.71	0.52	0.97	1.57	0.89	2.76

Nota: As comparações entre os grupos foram realizadas com o teste do qui-quadrado. O risco relativo (RR) seguido do intervalo de confiança foram estimados para quantificar a possível associação entre os grupos. Foi considerado estatisticamente relevante quando o intervalo de confiança não continha o valor 1. REF significa o controle em cada coluna. Dados apresentados em percentagem; intervalo de confiança (%; IC 95%). N: número; %: percentagem; QI: Quartil inferior, QS: Quartil superior.

Além disso, quando os oócitos atingiram aproximadamente 9 minutos de exposição ao ES utilizando o protocolo de equilíbrio longo, alterações morfológicas na superfície dos oócitos semelhantes a bolhas com formato de membrana irregular e protruções (Figura 3)

foram observadas recorrentemente. Notavelmente, essas alterações transitórias apareceram mais intensamente no IRV, ocasionalmente no T4, e não foram observadas nos oócitos T4-LC/FA (Figura 3).

Figura 3 – Visualização dos oócitos de camundongos C57BL/6 quando expostos à solução de equilíbrio (ES) – tempo total 9 minutos durante protocolo ES10MIN



Nota: Imagens obtidas em um estereomicroscópio Nikon SMZ 745 usando uma ampliação de zoom de 7,5x. As setas indicam bolhas que apareceram após nove minutos de exposição ao redor do espaço perivitelino dos oócitos

Embora os tempos de equilíbrio avaliados aqui não afetem as taxas de fertilização de oócitos IRV (RR = 1,12, IC 95%: 0,89-1,42), as taxas de formação de blastocistos em D4 (IRV: RR: 3,69, IC 95%: 1,11- 12,26) e taxas cumulativas (RR = 1,79, IC 95%: 1,01-3,16) foram significativamente reduzidas pela longa fase de equilíbrio. Portanto, o risco de taxas reduzidas de embriões D4 de oócitos expostos a ES-10MIN no IRV é 3,69 vezes maior em comparação com o protocolo curto. Por outro lado, não foram encontradas diferenças nas taxas de fertilização de oócitos expostos a protocolos de equilíbrio curto ou longo usando T4 (T4: RR = 1,1, IC de 95%: 0,87-1,40) ou T4/LC-FA (T4-LC/FA: RR = 1,10, IC 95%: 0,901-1,34), bem como nas taxas de blastocistos D4 (T4 = RR: 1,33, IC 95%: 0,52-3,41; e T4-LC/FA = RR: 1,76, 95% CI: 0,77-4,01). As taxas cumulativas de blastocistos, no entanto, foram significativamente menores em oócitos T4 equilibrados por 10 minutos vs. 7 minutos (RR: 1,56, IC de 95%: 1,05-2,31), e não diferiram em T4-LC/FA (RR: 0,78, IC 95%: 0,48-1,29).

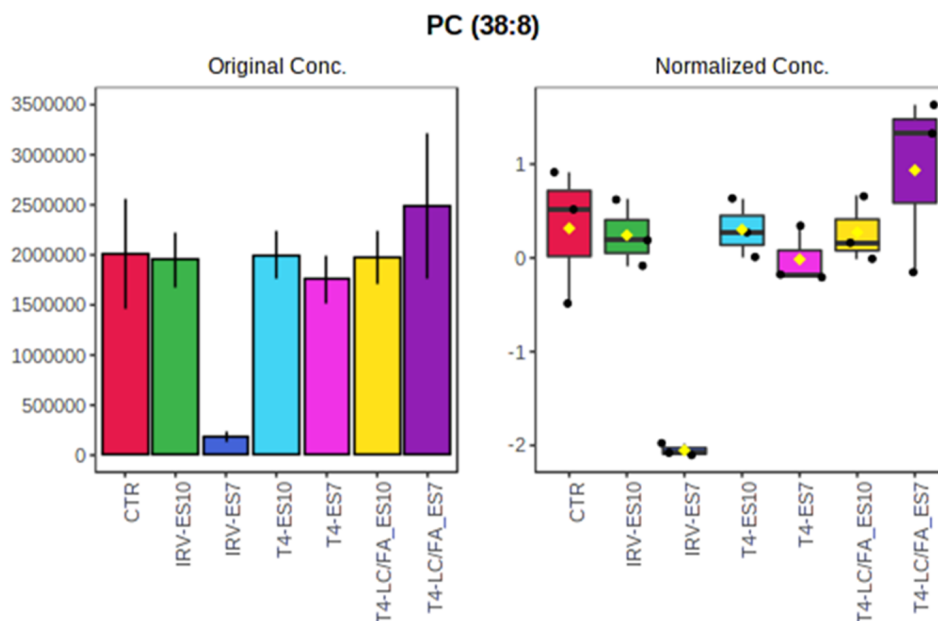
5.3 Efeitos da composição ES nas taxas de sobrevivência e resultados de fertilização *in vitro* de oócitos aquecidos vitrificados

As comparações entre as composições ES considerando cada tempo de equilíbrio separadamente não mostraram diferenças significativas na sobrevivência dos oócitos e nas taxas de fertilização (Tabela 1). Quando oócitos frescos e vitrificados-aquecidos foram comparados, as taxas de fertilização em ambos os grupos IRV e T4 expostos a ES-7MIN não diferiram do CTR, enquanto a exposição a ES-10MIN resultou em taxas de fertilização significativamente reduzidas em IRV (RR = 0.82, IC 95%: 0.68-0.99) e T4 (RR = 0.80, IC 95%:0.66-0.97) (Tabela 1). Curiosamente, a porcentagem de oócitos fertilizados de T4-LC/FA não diferiu do CTR, independentemente da duração do equilíbrio (Tabela 1). Com relação ao desenvolvimento embrionário, as taxas de blastocistos no D4 foram significativamente menores no IRV (RR = 0.56, IC 95%:0.32-0.97), T4 (RR = 0.40, IC 95%:0.22-0.75) e T4-LC/FA (RR = 0.54, IC95%:0.32-0.89) em comparação com o CTR após o equilíbrio dos oócitos por 7 minutos ou 10 minutos em IRV (RR = 0.15, IC95%:0.05-0.45), T4 (RR = 0.30, IC95%:0.14-0.63) e, T4-LC/FA (RR=0.31, IC95%:0.15-0.60) (Tabela 1). Contudo, as taxas de formação de blastocistos não diferiram entre IRV, T4 ou T4-LC/FA em cada tempo de equilíbrio avaliado (Tabela 1). Embora nenhuma diferença estatística tenha sido observada, os oócitos expostos ao protocolo de equilíbrio longo em meios T4 e T4-LC/FA originaram 50% mais embriões D4 em comparação com IRV (18,75% e 18,92% vs. 9,38%, respectivamente; Tabela 1). As taxas cumulativas de blastocistos de oócitos equilibrados por 10 minutos em IRV (34.37%, RR = 0.45, IC95%:0.28-0.74), T4 (50%, RR = 0.66, IC95% :0.46-0.94), e T4-LC/FA (54.05%, RR = 0.71, IC95%:0.52-0.97), foram significativamente menores em comparação com o grupo CTR (76,19%), e também entre T4-LC/FA (42.42%, RR = 0.56, IC95%:0.37-0.84) vs. CTR (76,19%) se o protocolo ES-7MIN foi aplicado (Tabela 1), mas não diferiram se as composições ES foram comparadas considerando cada tempo de equilíbrio separadamente sem o grupo CTR (Tabela 1). Ao comparar os resultados de FIV entre os grupos T4 e T4/LC-FA, foi encontrada uma taxa de blastocistos cumulativa reduzida de oócitos expostos a ES-7MIN em T4-LC/FA (RR: 0,54; IC95%: 0,35-0,84), mas esta diferença não foi observada no longo tempo de equilíbrio (Tabela 1).

5.4 Efeitos de diferentes tempos de equilíbrio e composições ES no perfil lipídico de oócitos

A análise one-way ANOVA considerando o CTR versus os seis grupos ES (IRV, T4 e T4-LC/FA) expostos a ES por 7 ou 10 minutos, mostrou a menor abundância relativa de fosfatidilcolina PC (38:8) em oócitos IRV expostos a ES-7MIN ($p=0.000209$; figura 4).

Figura 4 - Efeitos de diferentes tempos de equilíbrio e composições ES no perfil lipídico de oócitos.

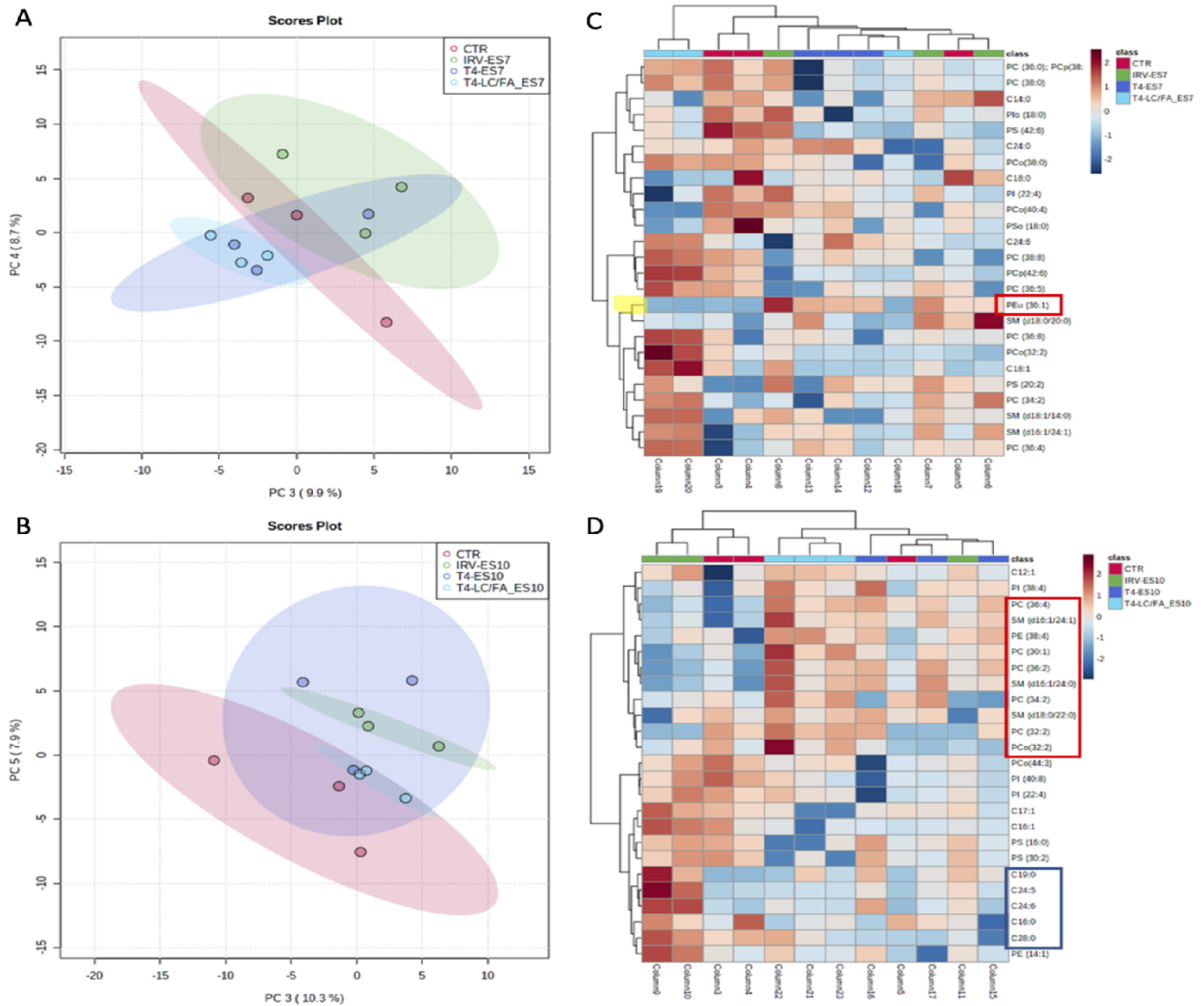


Nota: One-way ANOVA mostrando a fosfatidilcolina PC (38:8) regulada negativamente em oócitos de IRV de ES-7MIN. Comparação entre CTR e todos os grupos ES (IRV, T4 e T4-LC/FA expostos a ES por 7 ou 10 minutos). Asteriscos significam diferenças significativas (em $p<0,05$). Linhas indicam os desvios padrão (\pm SD), os losangos amarelos representam as médias, as linhas horizontais representam a mediana, as caixas representam os erros padrão (\pm SE); (a.u. = unidades arbitrárias).

Nenhum lipídio significativo foi detectado por ANOVA considerando os grupos CTR vs. ES-7MIN ou CTR vs. ES-10MIN, independentemente da composição ES. Mas uma tendência de discriminação entre as amostras CTR e ES no PCA foi observada em ambos os tempos de equilíbrio (Figura 5A-B), indicando o impacto da fase de equilíbrio no perfil lipídico da membrana do oócito. Também é possível observar que os oócitos T4-LC/FA expostos ao ES-10MIN aparecem mais próximos dos oócitos frescos (CTR) no PCA (Figura 5B). A análise de agrupamento demonstrou em oócitos CTR e T4-LC/FA de ES-7MIN uma abundância relativa baixa de PEO (36: 1) (Figura 5C). Em relação ao ES-10MIN, o perfil de AGL (Figura 5D, destacado em azul) foi bastante semelhante entre CTR, T4 e T4-LC/FA e

diferiu em comparação com IRV, com oócitos T4-LC/FA apresentando predominância de PC, PE e SM (Figura 5D, destacado em vermelho) em comparação com os outros grupos

Figura 5 - Perfil lipídico de oócitos equilibrados em diferentes composições ES por 7 ou 10 minutos.

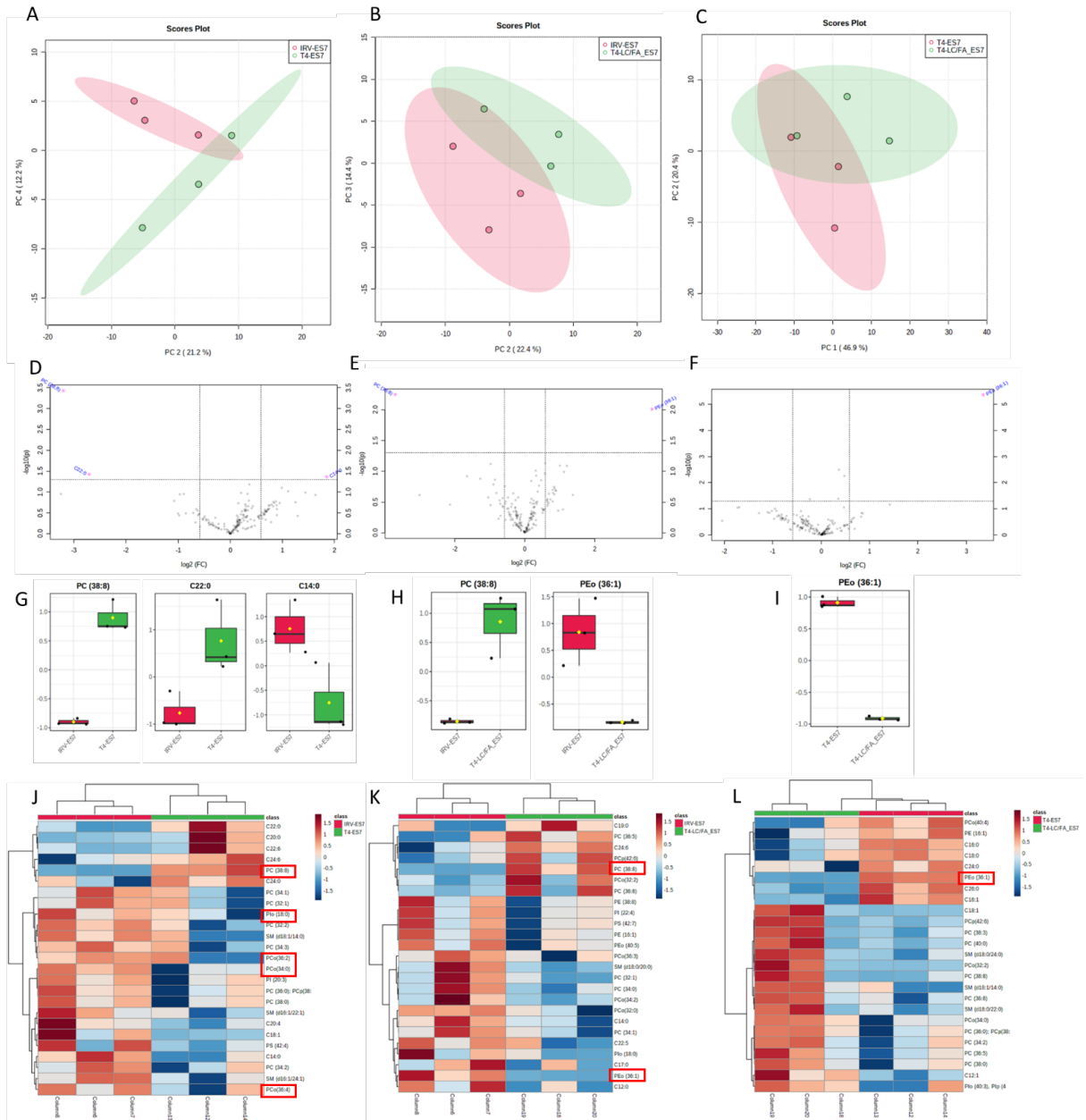


Nota: Perfil lipídico de oócitos equilibrados em diferentes composições ES por 7 ou 10 minutos em comparação com o grupo controle. Gráfico de pontuação – score plot de análise de componente principal (PCA) de 187 MRMs e análise de agrupamento hierárquico (heat map) dos 25 principais MRMs entre oócitos expostos à solução de equilíbrio (ES) durante 7 ou 10 minutos (ES-7MIN ou ES-10MIN) usando IRV, T4 ou meio T4-LC/FA. CTR = oócitos não expostos a ES. Oócitos CTR e ES-7MIN apresentando tendência de separação em PCA (A) e baixa concentração relativa de PEO (36: 1) em CTR e T4-LC/FA (C). Oócitos CTR e ES-10MIN: uma tendência de separação entre as amostras CTR e IRV é observada no PCA (B); heat map mostrando uma separação completa de T4-LC/FA dos outros dois grupos (D). Além disso, uma maior abundância relativa de fosfolípidios (PC, PE, SM) em oócitos T4-LC/FA (D destacado em vermelho) e menor concentração de AGL em comparação com IRV (D destacado em azul).

5.5 Efeitos da composição ES no perfil lipídico do oócito

Nos grupos ES-7MIN, a análise multivariada por PCA indicou uma tendência de separação entre IRV vs. T4 (Figura 6A) e IRV vs. T4-LC/FA (Figura 6B). Inversamente, não ocorreu separação entre oócitos T4 e T4-LC/FA (Figura 6C). As comparações de 2 em 2 entre IRV, T4 e T4-LC/FA usando o Volcano plot (p -valor $<0,05$ e fold change $>1,5$) detectaram 3, 2 e 1 lipídios significativos entre IRV vs. T4, IRV vs. T4-LC/FA, e T4 vs. T4-LC/FA (fig. 6D-F e G-I), respectivamente, com o PC (38:8) exibindo uma abundância mais baixa em IRV (fold change = 0,076 e $p = 0,0097$) em comparação com T4 ou T4-LC/FA (Fig. 6G-H), e a fosfatidiletanolamina PEO (36:1) superrepresentada em IRV (fold change = 12,5 e $p = 0,0056$; Fig. 6H e K, em destaque em vermelho no heatmap) em comparação com T4-LC/FA. Quando comparados oócitos T4 e T4-LC/FA, resultado semelhante foi observado com maior abundância relativa de PEO (36:1) em T4 (fold change = 10,17, fig. 6I e L). Curiosamente, uma maior abundância relativa de éter-lipídios como PLo (18:0), PLo (34:0), PLo (36:2), PLo (36:4) foi detectada por análise de agrupamento em IRV em comparação com T4 (Fig. 6J) e comparado a fig.6K, destacada em vermelho) enquanto uma alta relativa abundância de PC (38:8) ocorreu em T4 e T4-LC/FA (Fig.6J-K, destacada em azul).

Figura 6 - Alterações no perfil lipídico em oócitos expostos à solução de equilíbrio por 7 minutos.



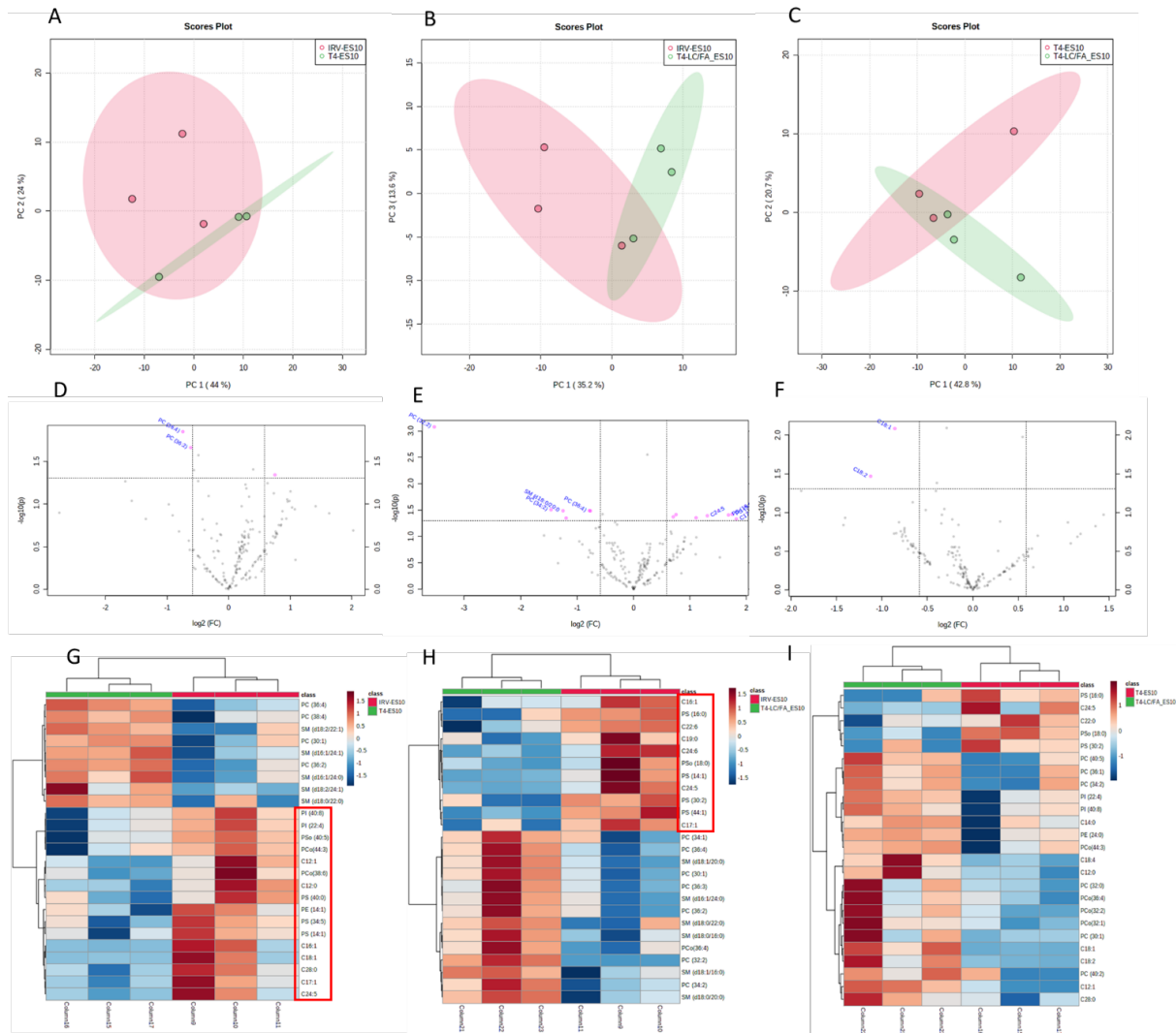
Nota: Alterações no perfil lipídico em oócitos expostos à solução de equilíbrio por 7 minutos. A-C: score plot resultante de PCA de 187 MRMs entre oócitos equilibrados em IRV vs. T4, IRV vs. T4-LC/FA e T4 vs. T4-LC/FA, indicando uma separação não clara de T4 vs. T4-LC/FA em C. D-F: análise de Volcano plot mostrando 3, 2 e 1 lipídios representados diferencialmente ($p < 0,05$) entre IRV vs. T4 (PC (38:8) $p = 0.00037$; C22:0 $p = 0.037$; C14:0 $p = 0.043$), IRV vs. T4-LC/FA (PC (38:8) $p = 0.00563$; PEO (36:1) $p = 0.00976$) e T4 vs. T4-LC/FA (PEO (36:1) $p = 0.00000434$), respectivamente. G-I: bloxplots da abundância relativa dos lipídios significativos selecionados pela pelo Volcano plot, losangos amarelos representam as médias, as linhas horizontais representam a mediana, as caixas representam os erros padrão (\pm SE); linhas indicam desvio padrão (\pm SD).

J-L: Heatmap resultante da análise de agrupamento hierárquico dos 25 principais lipídios mostrando menor abundância relativa de lipídios de membrana e alta concentração de AGL em IRV em comparação com T4 e T4-LC/FA, éter-lipídios significativos selecionados pelo Volcano plot estão

destacados em vermelho. Uma alta relativa abundância de PC (38:8) ocorreu em T4 e T4-LC/FA (destacado em azul); N: 3 replicatas.

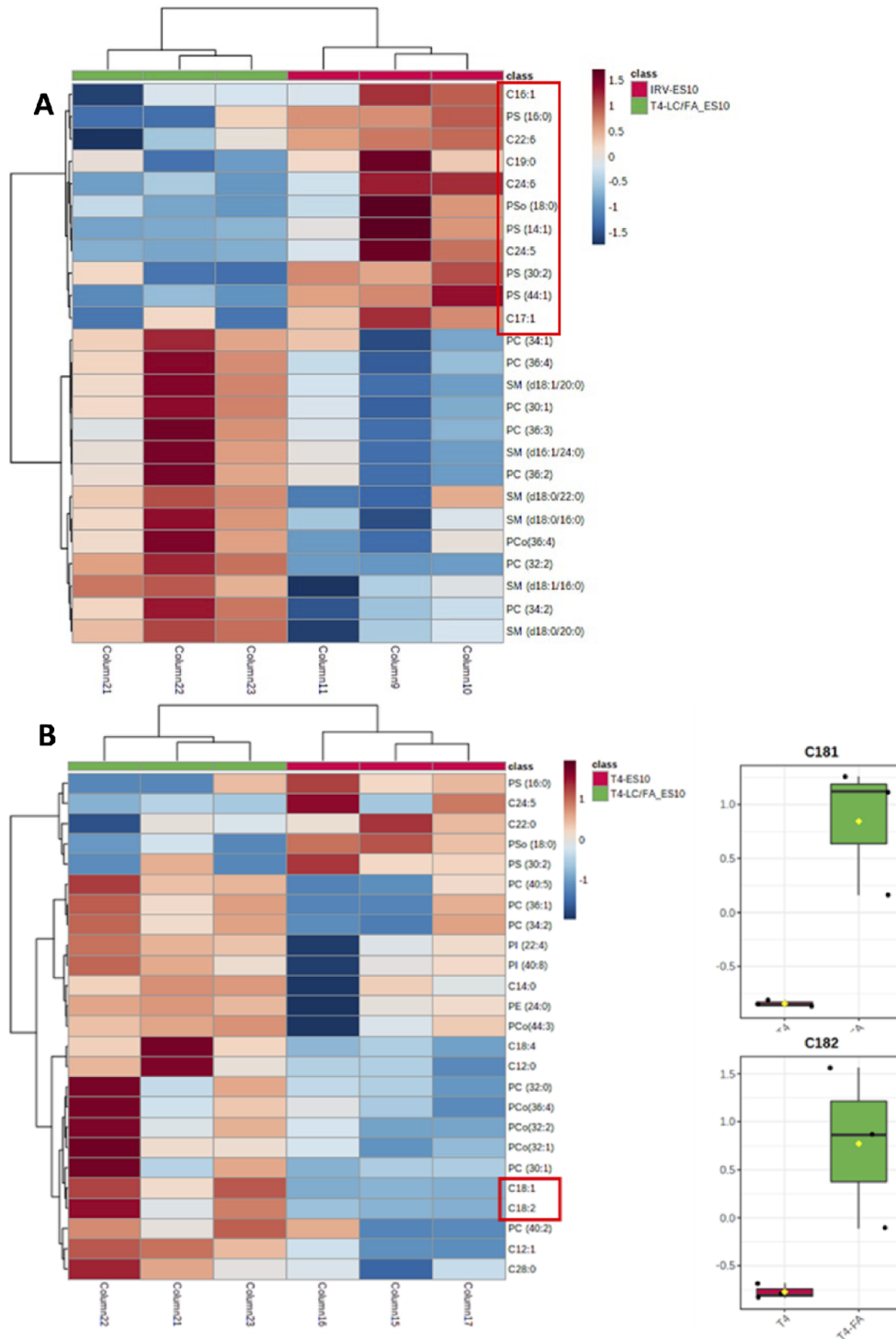
Em relação aos grupos ES-10MIN, PCA não mostrou separação das amostras IRV, T4 e T4-LC/FA (Fig. 7A-C), mas detectamos 3, 13 e 2 lipídios diferencialmente representados ($p < 0,05$) entre IRV vs. T4, IRV vs. T4-LC/FA e T4 vs. T4-LC/FA, respectivamente (ver Fig. 7D-F; Figura 8A-B). Entre os 25 principais lipídios selecionados por análise de agrupamento em oócitos IRV expostos ao protocolo de equilíbrio longo, em comparação com T4 e T4-LC/FA, haviam 8 ácidos graxos livres, uma fosfatidiletanolamina PEO (36:1), fosfatidilcolinas PCo (32:0) e PC (36:3), fosfatidilserinas PS (14:1), PS (16:0), PS (30:2), PSo (40:5) e fosfatidilinositóis PI (22:4) e PI (40:8), enquanto PC insaturado e SM predominaram em oócitos T4 e T4-LC/FA (Fig. 7G-H). Digno de nota, lipídios significativos, observados por análise univariada (Fig. 7F) e análise de agrupamento (Fig. 7I) entre T4 e T4-LC/FA, apontaram ácidos oleico (18:1) e linoleico (18:2) regulados positivamente em oócitos T4-LC/FA (Figura 8B), mostrando uma maior abundância relativa em oócitos T4-LC/FA comparado a oócitos T4.

Figura 7 - Alterações no perfil lipídico em oócitos expostos à solução de equilíbrio por 10 minutos.



Nota: Alterações no perfil lipídico em oócitos expostos à solução de equilíbrio por 10 minutos. A-C: gráfico de pontuação- score plot resultante de PCA de 187 MRMs entre oócitos equilibrados em meio IRV vs. T4, IRV vs. T4-LC/FA e T4 vs. T4-LC/FA indicando uma separação não clara das amostras. D-F: análise de Volcano plot mostrando 3, 13 e 2 lipídios diferencialmente representados ($p < 0,05$) entre IRV vs. T4, IRV vs. T4-LC/FA e T4 vs. T4-LC/FA, respectivamente. G-I: heat map resultante da análise de agrupamento hierárquico dos 25 principais lipídios mostrando um padrão de degradação da membrana (abundância relativa reduzida de lipídios de membrana e alta concentração de AGL) no IRV em comparação com T4 e T4-LC/FA (G-H). N= 3 replicatas.

Figura 8 - Perfil lipídico de oócitos expostos a uma solução de equilíbrio padrão (ES) ou ES suplementado com ácidos graxos e L-carnitina (T4-LC/FA).

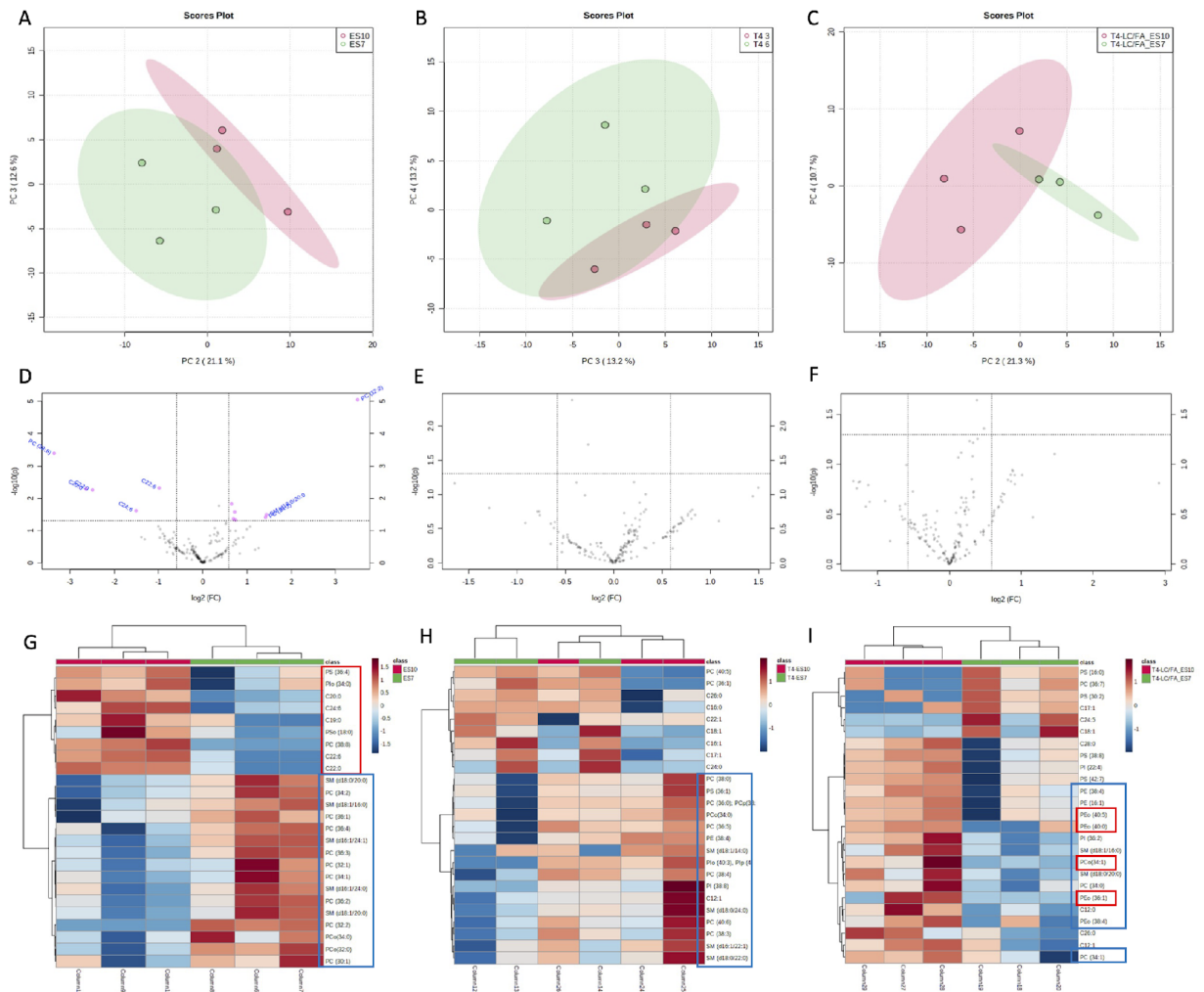


Nota: A: heat map resultante da análise de agrupamento hierárquico dos 25 principais lipídios de uma lista de 187 MRMs mostrando uma separação completa de IRV dos oócitos T4-LC/FA expostos ao protocolo ES-10MIN representados na cor vermelha e verde, respectivamente. Observe a predominância de AGL e PS em oócitos IRV (destacados em vermelho). B: observe os ácidos oleico (C18:1) e linoléico (C18:2) usados como suplementos no ES (destacado em vermelho) e a abundância relativa desses ácidos graxos em oócitos dos grupos T4 e T4-LC/FA

5.6 Efeitos dos tempos de equilíbrio no perfil lipídico do oócito: comparação intra-grupo

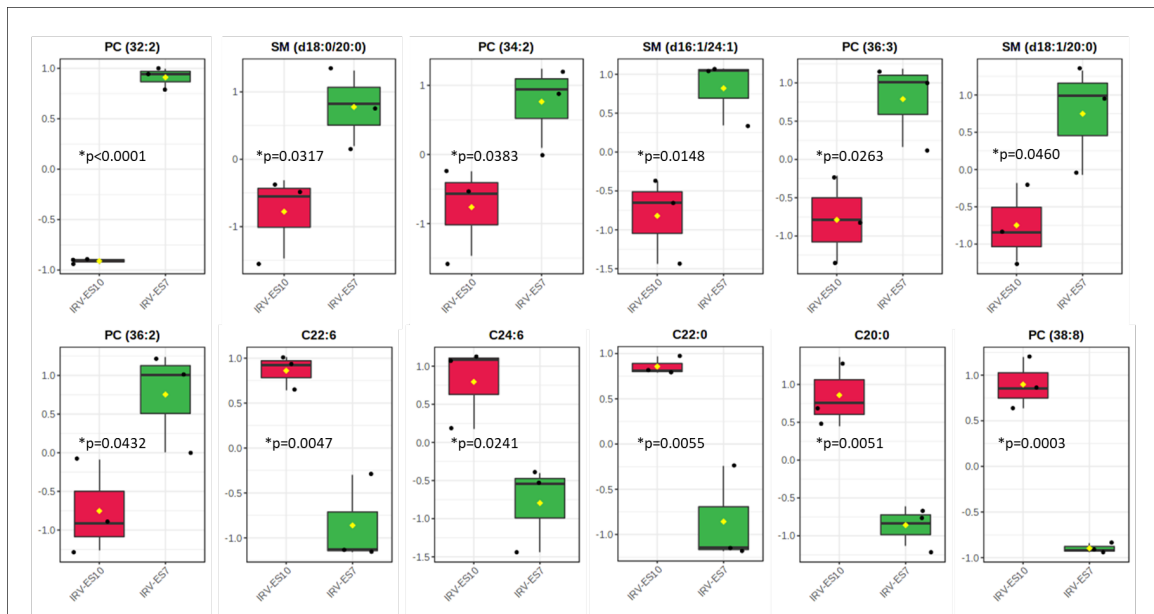
Para visualizar melhor os efeitos dos tempos de equilíbrio no perfil lipídico do oócito, realizamos PCA aos pares ES7MIN versus ES-10MIN em cada composição ES (IRV, T4 e T4-LC/FA) (Figura 9A-C). Uma clara discriminação entre oócitos IRV expostos a ES por 7 ou 10 minutos pode ser observada em PCA (Figura 9A) e 12 lipídios significativos foram detectados por Volcano plot (Fig. 9D; Fig.10). A análise de agrupamento confirmou esses resultados, evidenciando maior abundância relativa de AGL, PS e PC (38:8) em oócitos IRV expostos a ES-10MIN em comparação com ES-7MIN. Uma queda significativa na abundância relativa de PC (38:8) em oócitos IRV de ES-7MIN, como apontado por ANOVA (Fig. 4) pode ter contribuído para esta diferença. Os tempos de equilíbrio não foram discriminados por PCA em T4 (Figura 9B), mas uma tendência de separação foi observada em oócitos T4-LC/FA (Figura 9C). Nenhuma diferença no perfil lipídico, no entanto, foi detectada por Volcano plot em relação aos tempos de equilíbrio em T4 e T4-LC/FA (Figura 9E-F). Também foi possível observar que, inversamente ao IRV, o protocolo ES-10MIN favoreceu uma maior abundância relativa de fosfolipídios em ambos os oócitos de T4 e T4-LC/FA (Figura 9G-I, destacado em azul). Notavelmente um aumento no fold change de éter-lipídios relacionadas a duração do tempo de equilíbrio foi observado em oócitos T4-LC/FA (Figura 9I, destacada em vermelho).

Figura 9 - Impacto dos tempos de equilíbrio no perfil lipídico do oócito.



Nota: A-C: gráfico de pontuação – score plot resultante do PCA dos 187 MRMs entre os tempos de equilíbrio, indicando a discriminação de oócitos IRV expostos a ES-7MIN ou ES-10MIN (A). Nenhuma separação foi observada em T4 (B), e uma tendência de separação ocorreu nas amostras T4-LC/FA (C). D-F: análise do gráfico Volcano plot mostrando fosfolípidios e ácidos graxos livres representados diferencialmente em oócitos expostos a ES-7MIN (verde) ou ES10 (vermelho) em meio IRV (D); não foram observadas características significativas nos meios T4 e T4-LC/FA (E e F). GI: heat map resultante da análise de agrupamento hierárquico dos 25 principais lipídios mostrando uma separação completa dos tempos de equilíbrio em IRV e T4-LC/FA; note que em T4 a nenhuma separação clara foi observada (H). Consulte o texto para obter detalhes sobre as classes de lipídios destacadas em vermelho e azul em cada heatmap.

Figura 10 - Lípidos de membrana e ácidos graxos livres (AGL) em oócitos equilibrados em IRV por 10 minutos.

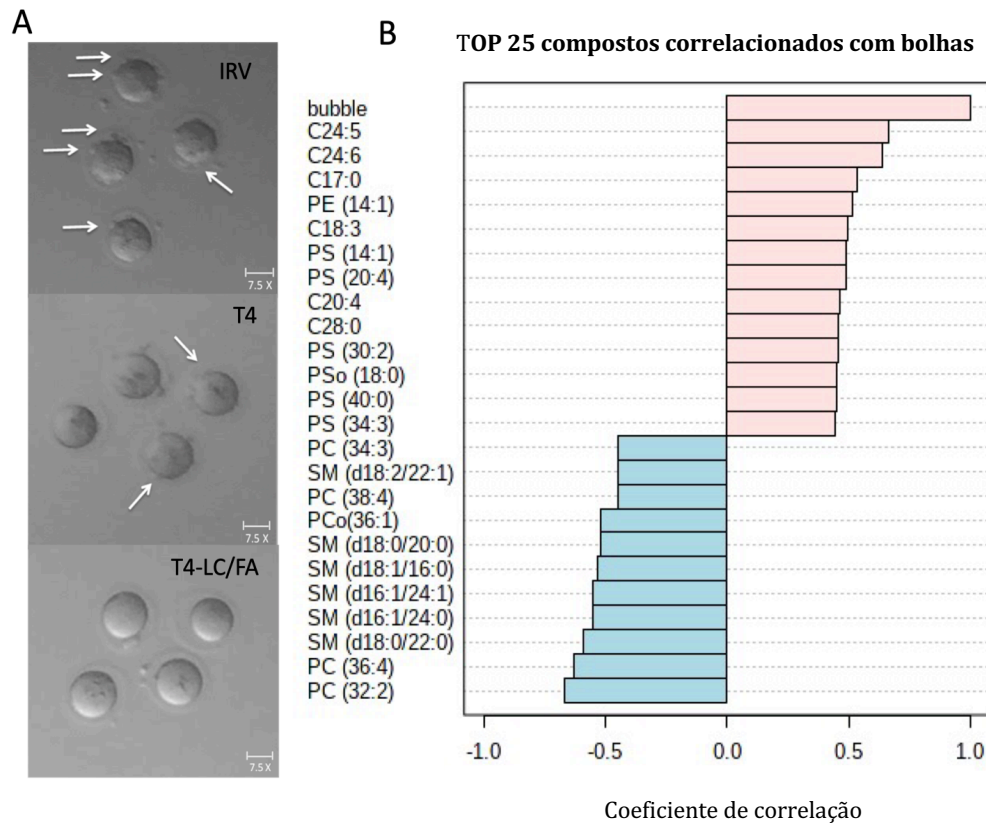


Nota: Doze lípidos de membrana e ácidos graxos livres (AGL) selecionados pelo volcano plot (p -valor $< 0,05$ e $\text{fold change} > 1,5$) em oócitos equilibrados em IRV por 10 minutos. Os oócitos apresentaram significativa abundância relativa reduzida de oito fosfolípidios (PC e SM) e quatro AGL regulados positivamente em comparação ao IRV-ES7MIN. Asteriscos significam diferença estatística; Linhas: desvio padrão (\pm SD); Losango amarelo: médias; Linhas horizontais: medianas; Caixas: erro padrão (\pm SE); (a.u. = unidades arbitrárias).

5.7 Relação entre bolhas e perfil lipídico da membrana oocitária

Para investigar se as bolhas são paralelas às rupturas de membrana, realizamos uma análise de correlação entre os grupos que formaram bolhas e o que não formou. Curiosamente, algumas classes de PS e AGL foram reguladas positivamente, enquanto os lípidos estruturais como PC e SM foram regulados negativamente em oócitos que mostraram bolhas durante a fase de equilíbrio longa (Figura 11). As comparações apresentadas referem-se às relações dos compostos ou suas quantidades relativas, ou seja, para a abundância de íons nos perfis. Como exemplo, se o lipídio A é de maior abundância em comparação com outros lípidos, então resta provar se todos os lípidos foram regulados negativamente, exceto o lipídio A, ou se apenas o lipídio A foi regulado positivamente. As quantidades relativas são biologicamente importantes, porque elas indicam alteração no metabolismo e nas relações lipídicas que determinam as propriedades celulares, como a fluidez da membrana.

Figura 11 –Relação entre a composição ES e o longo tempo de equilíbrio com aparecimento de bolhas na superfície do oócito e distúrbios do perfil lipídico da membrana.



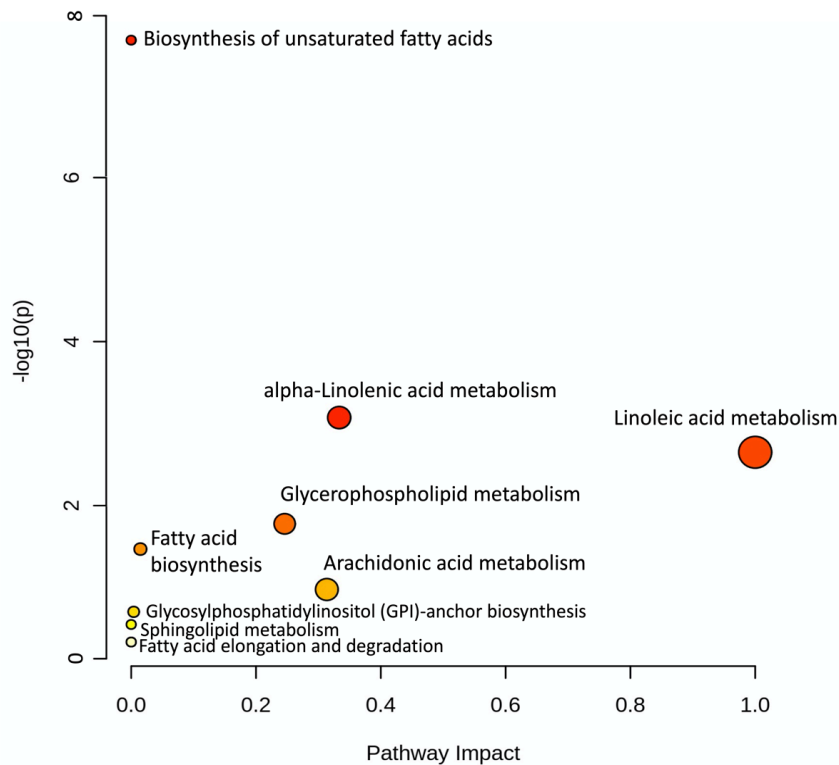
Nota: Relação entre a composição ES e o longo tempo de equilíbrio com aparecimento de bolhas na superfície do oócito e distúrbios do perfil lipídico da membrana. (A) Visualização de oócitos de camundongos C57BL/6J expostos a ES por 10 minutos (ES-10MIN). Nota: Imagens obtidas em um estereomicroscópio Nikon SMZ 745 usando uma ampliação de zoom de 7,5x. As setas indicam bolhas que apareceram após nove minutos de exposição ao redor do espaço perivitelino dos oócitos. (B) Análise de correlação mostrando os lipídios associados às bolhas em oócitos IRV submetidos ao protocolo ES-10MIN.

5.8 Identificação de vias metabólicas envolvidas em oócitos expostos a ES

Os oócitos expostos à fase de equilíbrio de vitrificação foram caracterizados por apenas 5 vias significativas, considerando um valor de $p < 0,05$, 3 dos quais também estavam abaixo do limite de taxa de descoberta falsa de 0,05 (FDR), conforme indicado: 1) biossíntese

de ácidos graxos insaturados ($p < 0,0001$); 2) metabolismo do ácido alfa-linolênico ($p < 0,001$); 3) metabolismo do ácido linoléico ($p = 0,0023$); 4) metabolismo dos glicerofosfolípidios ($p = 0,0167$); e 5) biossíntese de ácidos graxos ($p = 0,038$). Um deles (metabolismo do ácido linoléico) também teve o maior valor de impacto (1,00) entre todas as vias (Figura 12; Tabela 2).

Figura 12 - Análise da via gerada pelo MetaboAnalyst 5.0 usando os lipídios identificados de oócitos expostos à solução de equilíbrio de vitrificação.



Nota: Análise das vias mostrando todas as vias combinadas de acordo com os valores de p da análise de enriquecimento das vias (eixo y) e valores de impacto das vias da análise de topologia das vias (eixo x). A cor e o tamanho dos círculos são baseados nos valores de p e nos valores de impacto da via, respectivamente. Valores de p pequenos, círculos grandes e cores mais escuras indicam que o caminho é muito impactado.

Tabela 2 - Resultados detalhados da análise de vias, mostrando as vias mais relevantes associadas à fase de equilíbrio da vitrificação.

Vias	Com- ponentes totais	Alvos	p bruto	-log(p)	Ajuste Holm	FDR	Impacto
Biossíntese de ácidos graxos insaturados	36	8	2,11E-08	7,68E+0	1,77E-06	1,77E-06	0,00
Metabolismo do ácido alfa linolênico	13	3	8,44E-04	3,07E+0	7,00E-02	3,54E-02	0,33
Metabolismo do ácido linoléico	5	2	2,23E-03	2,65E+0	1,83E-01	6,26E-02	1,00
Metabolismo de glicerofosfolípídeo	36	3	1,67E-02	1,78E+0	1,00E+0	3,50E-01	0,25
Biossíntese de ácidos graxos	47	3	3,38E-02	1,47E+0	1,00E+0	5,69E-01	0,01
Metabolismo do ácido araquidônico	36	2	1,05E-01	9,78E-0	1,00E+0	1,00E+0	0,31
Biossíntese de âncora de GPI	14	1	1,97E-01	7,06E-01	1,00E+0	1,00E+0	0,00
Metabolismo de esfingolípídeos	21	1	2,81E-01	5,51E-01	1,00E+0	1,00E+0	0,00
Elongamento de ácido graxo	39	1	4,60E-01	3,37E-01	1,00E+0	1,00E+0	0,00
Degradação de ácidos graxos	39	1	4,60E-01	3,37E-01	1,00E+0	1,00E+0	0,00

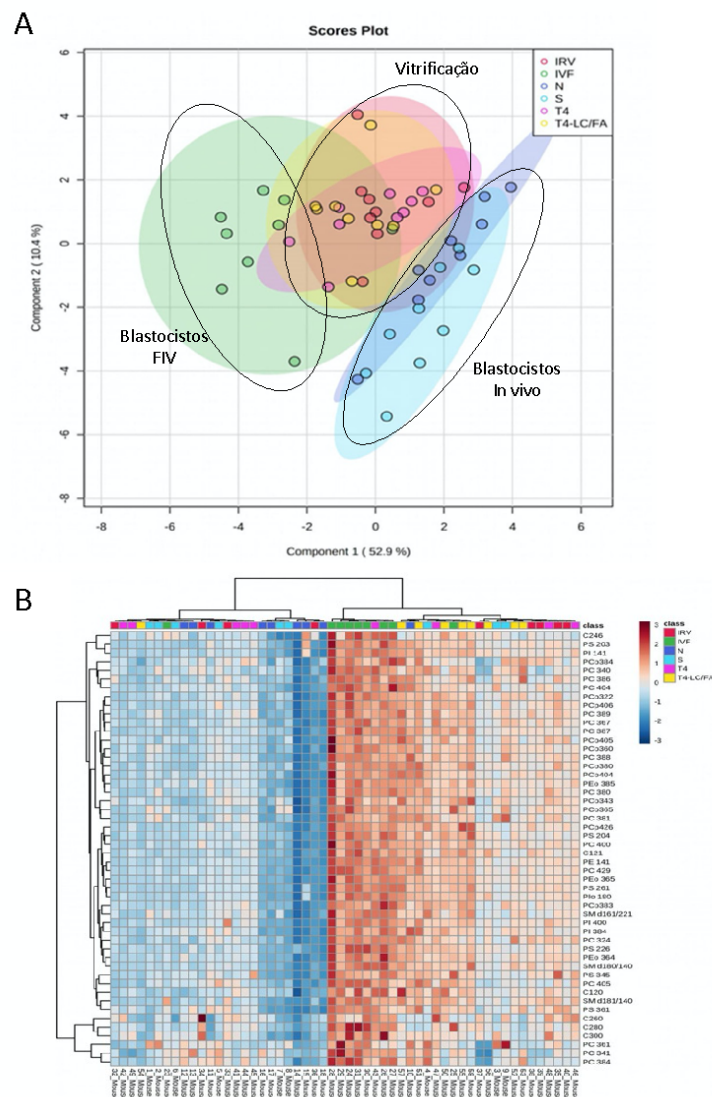
Nota: A via foi classificada de acordo com: Número total de compostos encontrados na base de dados KEGG envolvidos na via (Cmpd total), compostos analisados envolvidos nas vias (alvos), valor p calculado nos acertos (p bruto), valor p logarítmico (-log (p)), valor p ajustado por Holm-Bonferroni (ajuste Holm) valor p ajustado usando a taxa de descoberta falsa (FDR), o valor do impacto da via calculado a partir da análise da topologia da via (Impacto), GPI = glicosilfosfatidilinositol.

5.9 Efeitos de diferentes procedimentos das TRA no perfil lipídico de blastocistos

A análise ANOVA mostrou que 97 dos 125 lipídios investigados foram expressos de forma diferente entre os blastocistos dos grupos N, S, FIV e vitrificados (p-valor <0,05). Embora uma separação nítida entre os grupos experimentais não tenha sido detectada pela análise de PCA, é possível observar uma tendência de separação das amostras de embriões em 3 grupos, de acordo com os procedimentos de reprodução assistida: 1) grupos concebidos *in vivo* (N e S); 2) fertilização *in vitro* (FIV) com oócitos frescos; e 3) grupos de vitrificação

(Figura 13A). Os 50 principais recursos selecionados pela análise ANOVA de uma via em cada grupo são mostrados no heat map (Figura 13B). O padrão de abundância de metabólitos de acordo com as pontuações VIP foi $N < S < FIV$ para grupos *in vivo* vs. FIV, e $IRV < T4 < T4-LC/FA < FIV$ para grupos vitrificados vs. FIV.

Figura 13 - PCA e heat map da análise de agrupamento hierárquico de MRMs selecionados comparando acasalamento natural com (S) e sem superovulação (N), blastocistos produzidos *in vitro* resultantes de FIV após superovulação (FIV) e de oócitos vitrificados.

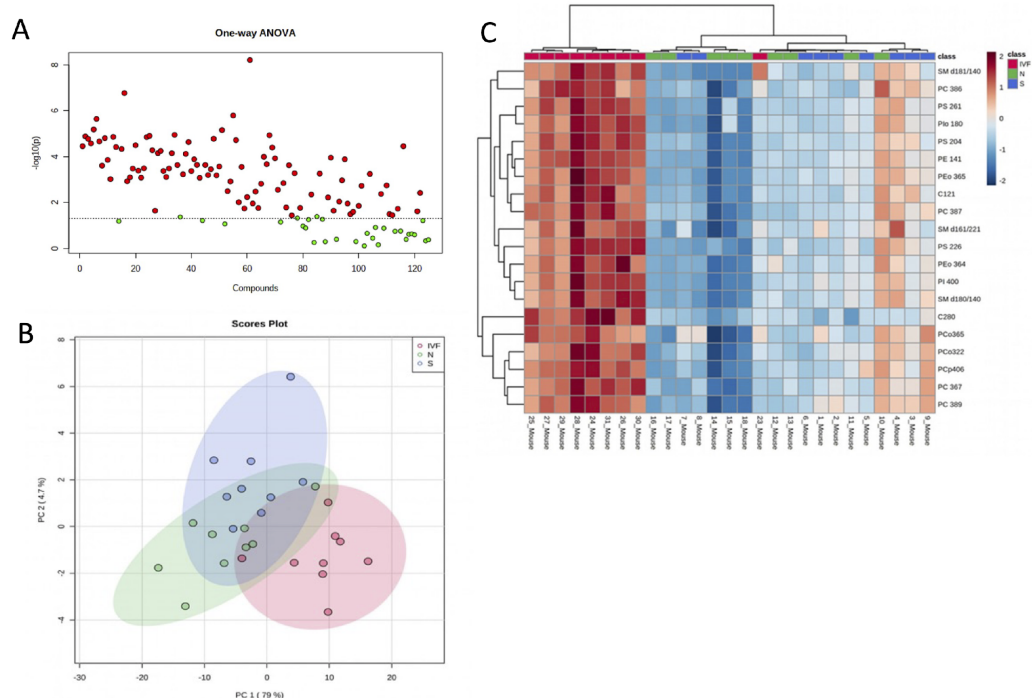


Nota: PCA e heat map da análise de agrupamento hierárquico de MRMs selecionados comparando acasalamento natural sem superovulação (N), acasalamento natural após superovulação (S), blastocistos produzidos *in vitro* resultantes de FIV após superovulação (FIV) e de oócitos vitrificados utilizando IRV, T4 ou T4-LC/FA. A distribuição das amostras em um gráfico de pontuação 2D após análise de PCA de 97 características selecionadas por ANOVA mostrando uma tendência de separação de FIV, grupos *in vivo* e vitrificados (A). Heat map resultante da análise de agrupamento hierárquico dos 50 principais metabólitos lipídicos selecionados por ANOVA (B).

5.10 Efeitos da estimulação ovariana e da fertilização *in vitro* no perfil lipídico de blastocistos

O perfil lipídico geral dos blastocistos foi modificado quando as intensidades relativas entre os grupos N, S e FIV foram comparadas. A análise ANOVA (p -valor $<0,05$) mostrou que 95 dos 125 lipídios investigados foram expressos de forma diferente entre os blastocistos de N, S e FIV (Figura 14A). Na PCA realizada com os 95 lipídios selecionados, os componentes principais (PCs) 1 e 2 explicaram 83,7% da variância do conjunto de dados e, embora não tenha mostrado separação completa entre os três grupos, a análise sugeriu uma separação do grupo de FIV (Figura 14B). A análise de cluster hierárquica dos 20 principais lipídios selecionados pela ANOVA confirmou esse padrão, com amostras de FIV agrupadas, como pode ser visto no heat map resultante (Figura 14C).

Figura 14 - ANOVA, PCA e heat map de análise de agrupamento hierárquico de MRMs selecionados comparando acasalamento natural com (S) e sem superovulação (N), e blastocistos produzidos *in vitro* resultantes de FIV após superovulação (FIV).



Nota: Características importantes selecionadas pelo gráfico ANOVA com valor $p < 0,05$ entre os blastocistos do grupo N, S e FIV (A). Distribuição das amostras em um gráfico de pontuação 2D após análise de PCA de 95 características selecionadas por ANOVA mostrando uma maior separação do grupo FIV em relação aos grupos N e S (B). Heatmap resultante da análise de agrupamento hierárquico dos 20 principais lipídios selecionados por ANOVA mostrando quase separação de amostras do grupo de FIV, indicando um acúmulo geral das espécies de lipídios analisados (C).

Os principais lipídios identificados por ANOVA e análise post-hoc podem ser vistos na Tabela 3. Os efeitos da estimulação ovariana e/ou FIV no perfil lipídico dos blastocistos foram responsáveis por 18, 94 e 78 lipídios significativos detectados entre os grupos N e S, N e FIV, e S e FIV, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Lista completa dos lipídios significativos diferencialmente representados em blastocistos de camundongos produzidos *in vivo* a partir de ciclos não estimulados (N) ou estimulados (S) e sob estimulação ovariana mais fertilização *in vitro* (FIV). Análise ANOVA de uma via; $p < 0,05$ e teste post-hoc.

Nome	f.valor	p.valor	$-\log_{10}(p)$	Taxa de descoberta falsa (FDR)	Teste post-hoc
C280	46,024	6,1214E-9	8,2132	7,6517E-7	IVF - N; IVF - S
SM d181/140	32,022	1,6831E-7	6,7739	1,0519E-5	IVF - N; IVF - S
PCo365	24,494	1,5978E-6	5,7965	6,6575E-5	IVF - N; IVF - S; S - N
PS 204	23,454	2,2607E-6	5,6458	7,0648E-5	IVF - N; IVF - S
PE 141	20,468	6,4961E-6	5,1873	1,3868E-4	IVF - N; IVF - S
PS 261	20,299	6,9167E-6	5,1601	1,3868E-4	IVF - N; IVF - S
PC 367	19,03	1,1187E-5	4,9513	1,3868E-4	IVF - N; IVF - S
PS 226	18,935	1,1608E-5	4,9352	1,3868E-4	IVF - N; IVF - S
PCo322	18,77	1,2377E-5	4,9074	1,3868E-4	IVF - N; IVF - S; S - N
C121	18,649	1,2978E-5	4,8868	1,3868E-4	IVF - N; IVF - S
PEo 364	18,521	1,3646E-5	4,865	1,3868E-4	IVF - N; IVF - S
PI 400	18,46	1,3979E-5	4,8545	1,3868E-4	IVF - N; IVF - S
SM d180/140	18,207	1,5448E-5	4,8111	1,3868E-4	IVF - N; IVF - S
PC 386	18,035	1,6542E-5	4,7814	1,3868E-4	IVF - N; IVF - S
PEo 365	18,02	1,6641E-5	4,7788	1,3868E-4	IVF - N; IVF - S
PIo 180	17,707	1,8872E-5	4,7242	1,4744E-4	IVF - N; IVF - S
PC 387	17,384	2,1516E-5	4,6672	1,5821E-4	IVF - N; IVF - S
SM d161/221	17,235	2,2878E-5	4,6406	1,5888E-4	IVF - N; IVF - S

(continua)

Nome	f.valor	p.valor	$-\log_{10}(p)$	Taxa de descoberta falsa (FDR)	Teste post-hoc
PC 389	16,896	2,6307E-5	4,5799	1,7307E-4	IVF - N; IVF - S; S - N
PCp406	16,46	3,1573E-5	4,5007	1,9733E-4	IVF - N; IVF - S
PC 429	16,233	3,4758E-5	4,4589	1,9779E-4	IVF - N; IVF - S
PC 342	16,23	3,4811E-5	4,4583	1,9779E-4	IVF - N; IVF - S
PCo383	16,041	3,773E-5	4,4233	2,0505E-4	IVF - N; IVF - S
PCo384	15,922	3,971E-5	4,4011	2,0682E-4	IVF - N; IVF - S
PC 400	15,577	4,6099E-5	4,3363	2,305E-4	IVF - N; IVF - S
PCp426	15,292	5,2212E-5	4,2822	2,5102E-4	IVF - N; IVF - S
PCo360	15,136	5,592E-5	4,2524	2,5889E-4	IVF - N; IVF - S
PS 345	14,642	6,9713E-5	4,1567	3,0259E-4	IVF - N; IVF - S
C120	14,627	7,02E-5	4,1537	3,0259E-4	IVF - N; IVF - S
PCo343	14,473	7,5256E-5	4,1235	3,1357E-4	IVF - N; IVF - S; S - N
C300	13,828	1,0119E-4	3,9949	4,0803E-4	IVF - N; IVF - S
C246	13,645	1,102E-4	3,9578	4,3046E-4	IVF - N; IVF - S
PC 340	13,508	1,175E-4	3,93	4,4507E-4	IVF - N; IVF - S
SM d181/200	13,314	1,2879E-4	3,8901	4,6122E-4	IVF - N; IVF - S
PCo405	13,308	1,2914E-4	3,8889	4,6122E-4	IVF - N; IVF - S
PC 324	13,165	1,382E-4	3,8595	4,7986E-4	IVF - N; IVF - S
PI 141	12,291	2,1124E-4	3,6752	7,1365E-4	IVF - N; IVF - S
PC 405	12,149	2,2665E-4	3,6447	7,1608E-4	IVF - N; IVF - S
PE 384	12,125	2,2935E-4	3,6395	7,1608E-4	IVF - N; IVF - S
PS 361	12,114	2,306E-4	3,6371	7,1608E-4	IVF - N; IVF - S
PS 203	12,078	2,3487E-4	3,6292	7,1608E-4	IVF - N; IVF - S
PEo 385	11,998	2,4437E-4	3,6119	7,273E-4	IVF - N; IVF - S
C184	11,818	2,6752E-4	3,5726	7,7767E-4	IVF - N; IVF - S
PC 360 PCp 386	11,736	2,7883E-4	3,5547	7,9213E-4	IVF - N; IVF - S; S - N
PCo380	11,459	3,2097E-4	3,4935	8,7668E-4	IVF - N; IVF - S
PC 404	11,429	3,2596E-4	3,4868	8,7668E-4	IVF - N; IVF - S
PCo404	11,407	3,2963E-4	3,482	8,7668E-4	IVF - N; IVF - S
PC 381	11,283	3,5133E-4	3,4543	9,1493E-4	IVF - N; S - N

(continua)

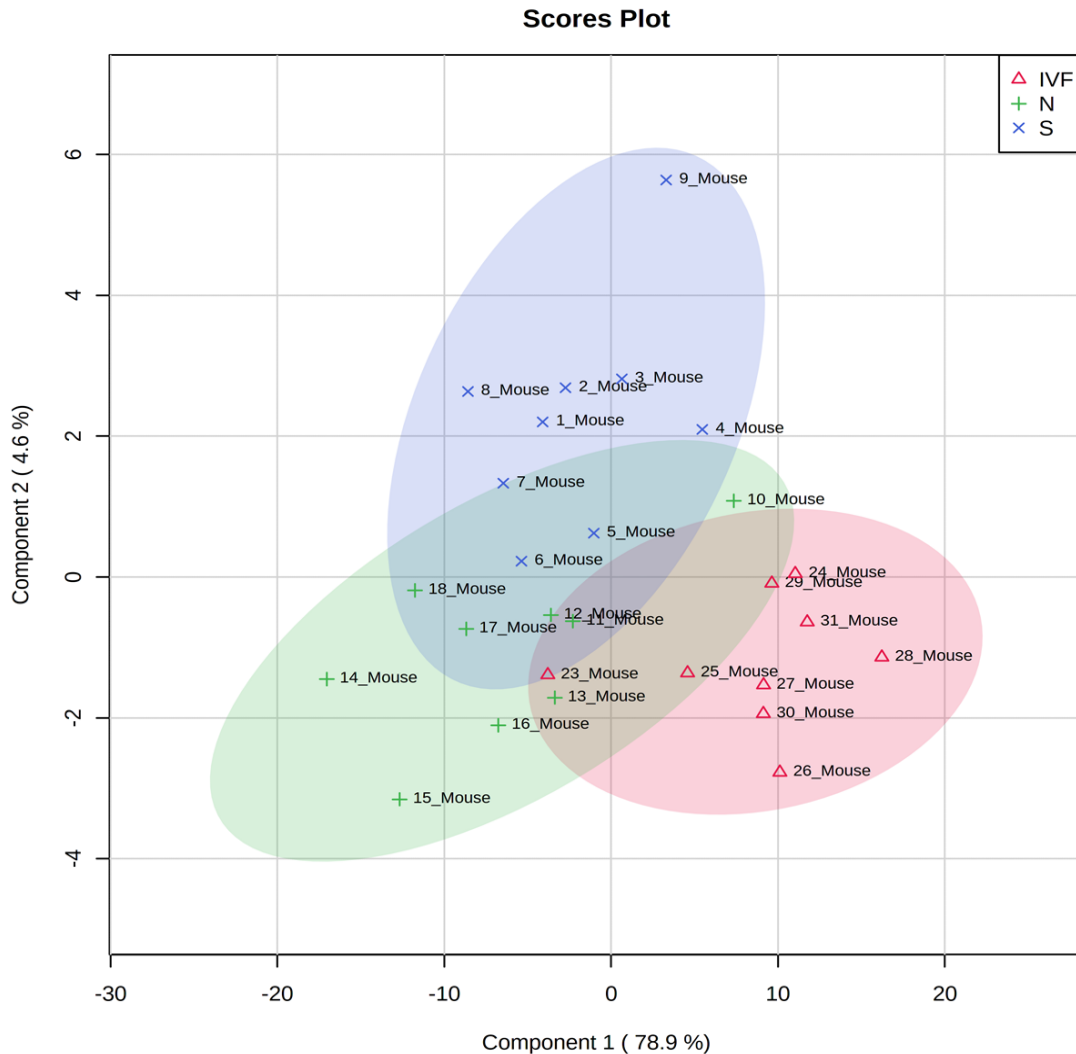
Nome	f.valor	p.valor	$-\log_{10}(p)$	Taxa de descoberta falsa (FDR)	Teste post-hoc
PC 380	11,017	4,0323E-4	3,3944	0,0010286	IVF - N; IVF - S
PC 388	10,952	4,1724E-4	3,3796	0,0010292	IVF - N; IVF - S
PC 406	10,939	4,1992E-4	3,3768	0,0010292	IVF - N; IVF - S
C260	10,519	5,243E-4	3,2804	0,0012603	IVF - N; IVF - S
SM d182/221	10,448	5,4469E-4	3,2638	0,0012847	IVF - N; IVF - S
PC 364	10,382	5,6414E-4	3,2486	0,0013059	IVF - N; IVF - S
PCo386	10,325	5,8164E-4	3,2353	0,0013219	IVF - N; IVF - S
C340	10,183	6,2803E-4	3,202	0,0014018	IVF - N; IVF - S
C161	10,126	6,4749E-4	3,1888	0,0014199	IVF - N; IVF - S
PEo 384	9,8257	7,6308E-4	3,1174	0,0016446	IVF - N; IVF - S
SM d180/240	9,7555	7,9313E-4	3,1007	0,0016804	IVF - N; IVF - S
PC 402	9,6985	8,1851E-4	3,087	0,0017052	IVF - N; IVF - S
PC 365	9,6674	8,3272E-4	3,0795	0,0017064	IVF - N; IVF - S
PI 384	9,4354	9,4753E-4	3,0234	0,0019103	IVF - N; IVF - S
PC 384	9,2211	0,001069	2,971	0,002121	IVF - N; IVF - S
PEo 362	9,0522	0,0011765	2,9294	0,0022979	IVF - N; IVF - S
PCo364	9,0216	0,0011972	2,9218	0,0023023	IVF - N; IVF - S
C225	8,7376	0,0014095	2,8509	0,0026695	IVF - N; S - N
C204	8,6239	0,0015057	2,8223	0,0028091	IVF - N; IVF - S
PC 363	8,3291	0,0017896	2,7472	0,0032897	IVF - N; S - N
C240	8,2569	0,0018676	2,7287	0,0033834	IVF - S; N - S
SM d182/241	7,6044	0,0027665	2,5581	0,0049402	IVF - N; IVF - S
PC 322	7,3859	0,0031647	2,4997	0,0055717	IVF - N; IVF - S
PCo361	7,3162	0,0033045	2,4809	0,005737	IVF - N; S - N
PC 341	7,1001	0,0037823	2,4222	0,0064766	IVF - N; IVF - S
SM d180/200	6,9311	0,0042078	2,3759	0,0071078	IVF - N; IVF - S
PC 300	6,8534	0,0044207	2,3545	0,0073679	IVF - N; IVF - S
PC 343	6,447	0,0057419	2,2409	0,0094438	IVF - N; IVF - S
C181	6,3907	0,0059564	2,225	0,0096696	IVF - N; S - N
PCo342	5,7672	0,0090103	2,0453	0,01444	IVF - N; S - N
SM d180/160	5,6671	0,0096422	2,0158	0,015257	IVF - N; IVF - S
PC 345	5,4899	0,010883	1,9633	0,016944	IVF - N; IVF - S

(continua)

Nome	f.valor	p.valor	$-\log_{10}(p)$	Taxa de descoberta falsa (FDR)	Teste post-hoc
SM d180/220	5,4769	0,01098	1,9594	0,016944	IVF - N; S - N
C171	5,1416	0,013853	1,8585	0,021118	IVF - N; IVF - S
PCo340	4,9126	0,01628	1,7884	0,024518	IVF - N
C221	4,8509	0,017009	1,7693	0,02527	IVF - N; IVF - S
PC 368	4,8366	0,017184	1,7649	0,02527	IVF - N
PC 383	4,77	0,018022	1,7442	0,026194	IVF - N
PC 361	4,7317	0,018522	1,7323	0,026612	IVF - N; S - N
PCo363	4,4665	0,022437	1,649	0,031627	IVF - N; S - N
PS 141	4,4615	0,022519	1,6475	0,031627	IVF - N; S - N
PC 362	4,3778	0,023939	1,6209	0,033248	IVF - N; S - N
PCo321	4,3106	0,025151	1,5995	0,034548	IVF - N
PC 320	4,0075	0,031499	1,5017	0,042797	IVF - N; IVF - S
SM d161/241	3,9867	0,031993	1,4949	0,043002	IVF - N
SM d161/240	3,8601	0,035197	1,4535	0,046804	IVF - N; S - N
SM d180/180	3,8259	0,03612	1,4422	0,047527	IVF - N; IVF - S

Usando a análise PLS-DA, que realiza uma classificação supervisionada, os resultados do gráfico de pontuação 2D foram muito semelhantes aos observados após PCA (Fig. 15), e os VIP scores, uma medida que resume a contribuição de uma determinada variável para a separação modelo, confirmou o padrão observado anteriormente.

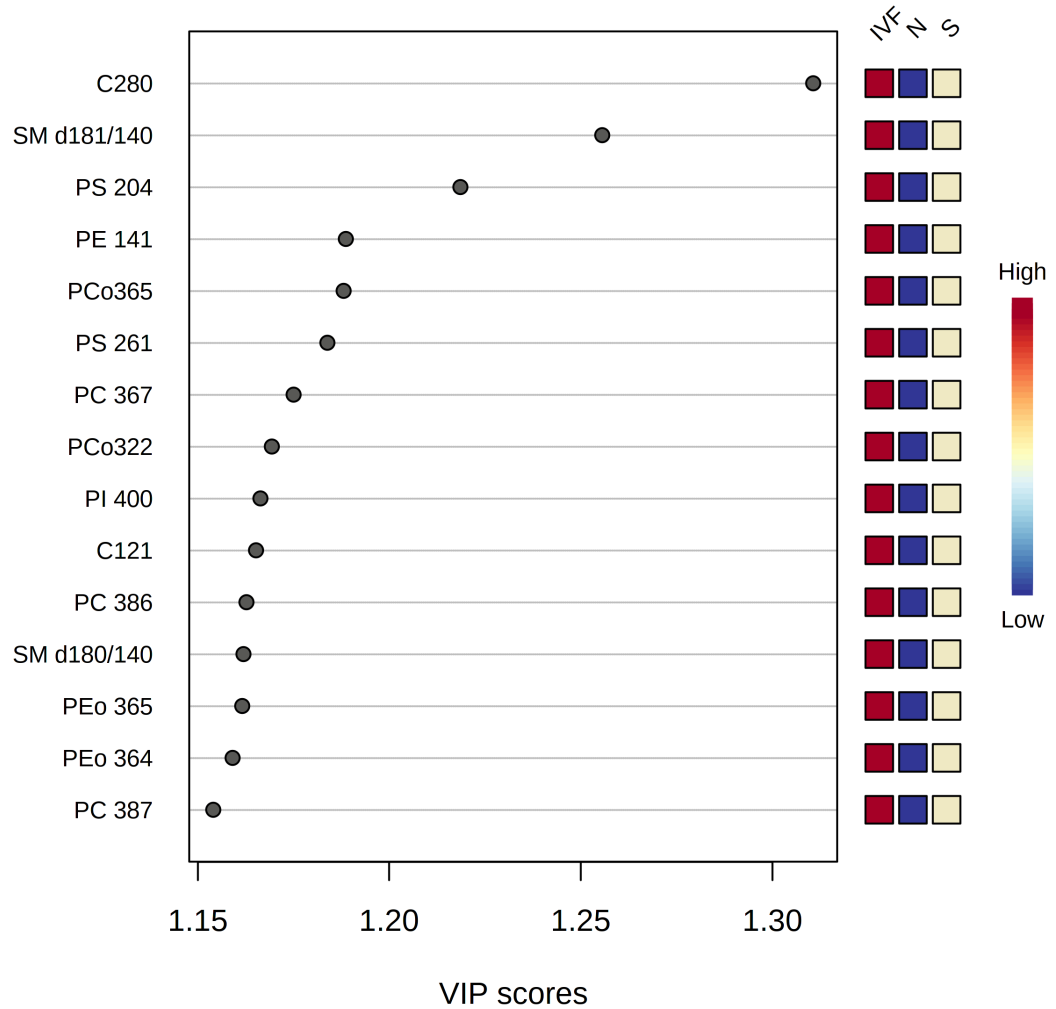
Figura 15 - Análise multivariada por PCA de amostras de blastocistos de ciclo natural (N), ciclo superovulado (S) e de fertilização *in vitro* (FIV).



Nota: Distribuição em um gráfico de pontuação 2D após análise de PCA de 95 características selecionadas por ANOVA mostrando uma maior separação do grupo FIV em relação aos grupos N e S.

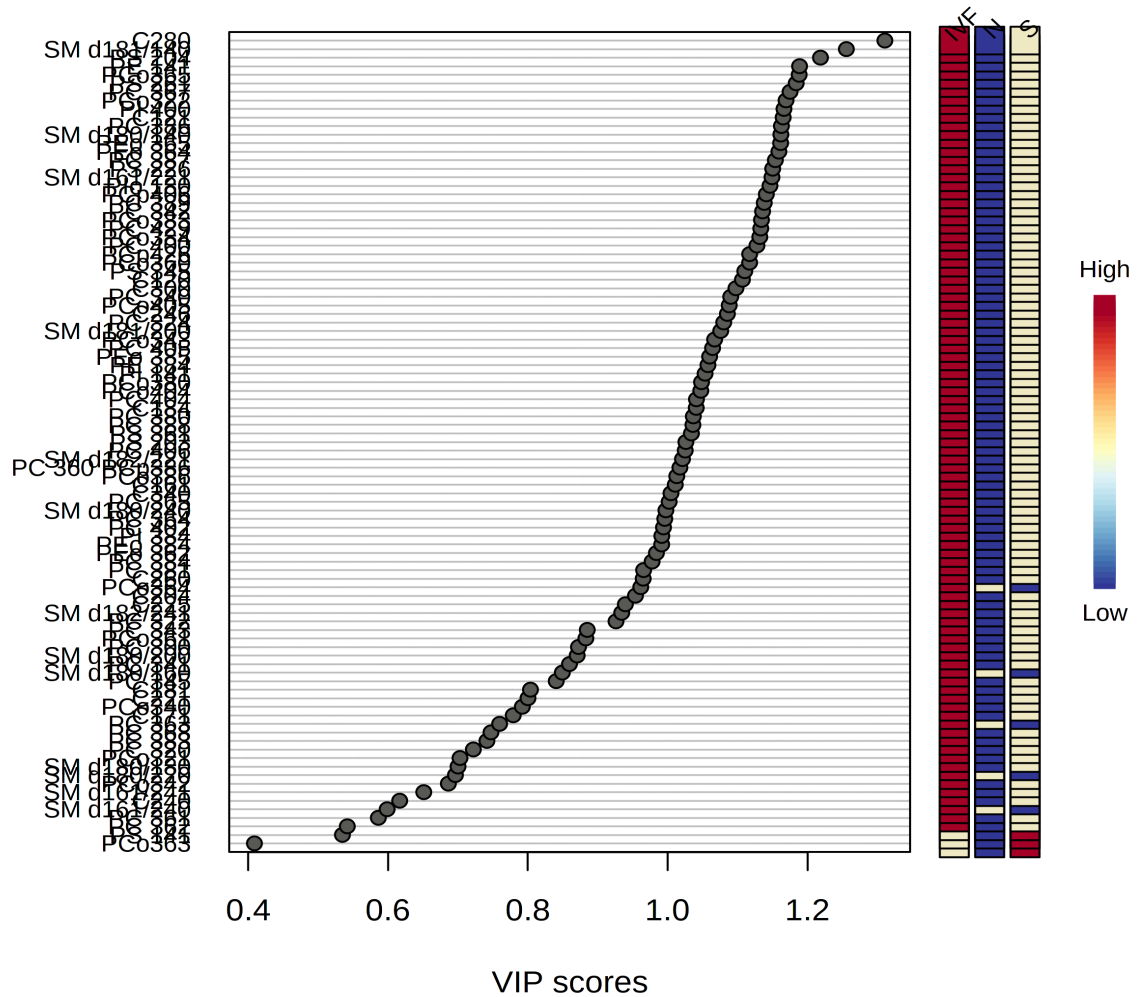
Todos os 15 principais lipídios selecionados pelo VIP score ($VIP > 1$) mostraram maior concentração relativa nas amostras do grupo FIV, seguido pelo grupo S e grupo N, respectivamente (Fig. 16). Esse padrão foi observado em todos, exceto em oito dos 95 metabólitos estudados (Fig. 17).

Figura 16 - As 15 principais variáveis PLS-DA de importância para as pontuações de projeção (VIP).



Nota: As caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas do metabólito correspondente, indicando que a abundância do metabólito tinha os seguintes grupos de ordem crescente: N < S < FIV.

Figura 17 - As 95 principais variáveis PLS-DA de importância para as pontuações de projeção (VIP) entre os grupos de FIV, N e S

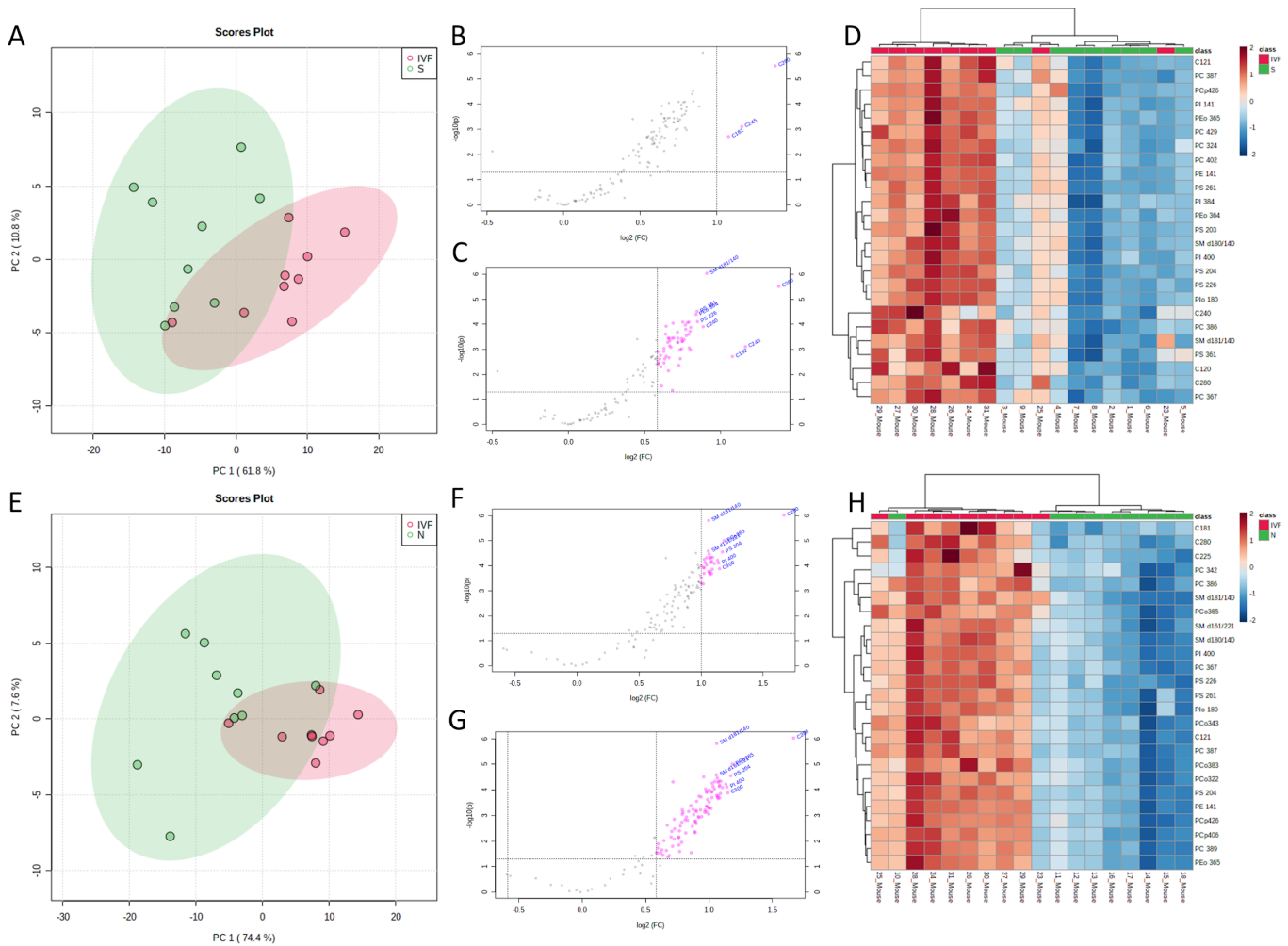


Nota: As caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas do metabólito correspondente, indicando a abundância do metabólito.

Essas descobertas foram confirmadas na comparação dois por dois com Volcano plot (fold change 2x e valor de $p < 0,05$). Esta análise detectou 0, 3 e 32 lipídios significativos na comparação entre os grupos N vs. S, S vs. IVF e N vs. IVF, respectivamente (ver Fig. 18A-C para comparações entre S vs. IVF e N vs. FIV). Configurando o fold change para 1,5x, a análise do Volcano plot identificou 10, 54 e 98 lipídios significativos entre os grupos N vs. S (Figura 19-D), S vs. FIV e N vs. FIV, respectivamente (Fig. 18C e G), indicando que a abundância lipídica contribuiu significativamente para as diferenças observadas. Embora PCA tenha demonstrado uma separação não clara entre S e N com sobreposição de amostras (Figura 19A), fold change $> 1,5x$ (Figura 19C) mostrou 15 PL regulado positivamente e esfingolipídios, incluindo algumas classes de fosfatidilcolinas: PC, PCo, fosfatidilserinas

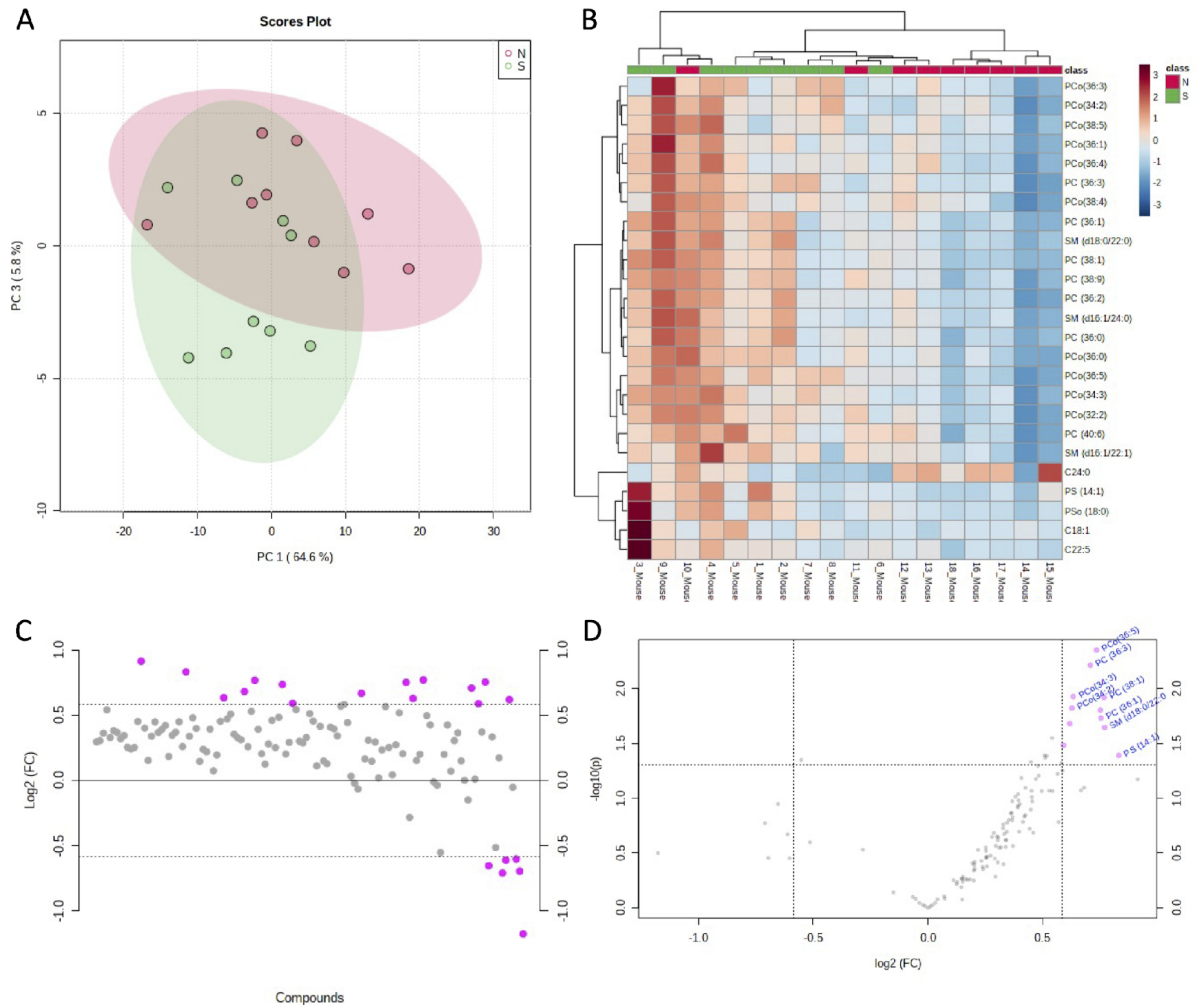
(PS), e esfingomielinas (SM), e 6 ácidos graxos livres (AGL) regulado negativamente: (C18:2, C19:0, C20:0, C20:1, C22:0 e C24:5) em blastocistos do grupo S. Além disso, volcano plot (Figura 19D) revelou uma maior abundância de 10 PL e 1 esfingolípido saturado (SM d18:0/22:0) associado à superovulação. Uma separação entre as amostras S e N foi observada por análises de cluster (Figura 19B). Foi observada uma tendência de separação entre as amostras de S x FIV e N x FIV (Fig. 18A e 19E), respectivamente com diferentes padrões de distribuição dos lipídios significativos de acordo com suas abundâncias relativas, como mostrado nos heat maps (Fig. 18D e H).

Figura 18 - Comparação do perfil lipídico entre as amostras de blastocisto dos grupos N, S e FIV.



Nota: Comparação do perfil lipídico entre as amostras de blastocisto dos grupos N, S e FIV mostrando gráficos de PCA e heat maps, respectivamente: S x FIV (A e D); N x IVF (E e H). Características importantes selecionadas pelo Volcano plot com limite de fold change (x) 2,0 (B e F) e 1,5 (C e G) e limite de testes t (y) 0,05. Os círculos vermelhos representam recursos acima do limite. Observe que o fold change e os valores de p são transformados em log. Quanto mais longe sua posição de (0,0), mais significativo é o recurso.

Figura 19 - Análise de MRMs selecionados entre blastocistos produzidos *in vivo* resultantes de acasalamento natural sem superovulação (N) e acasalamento natural após superovulação (S).



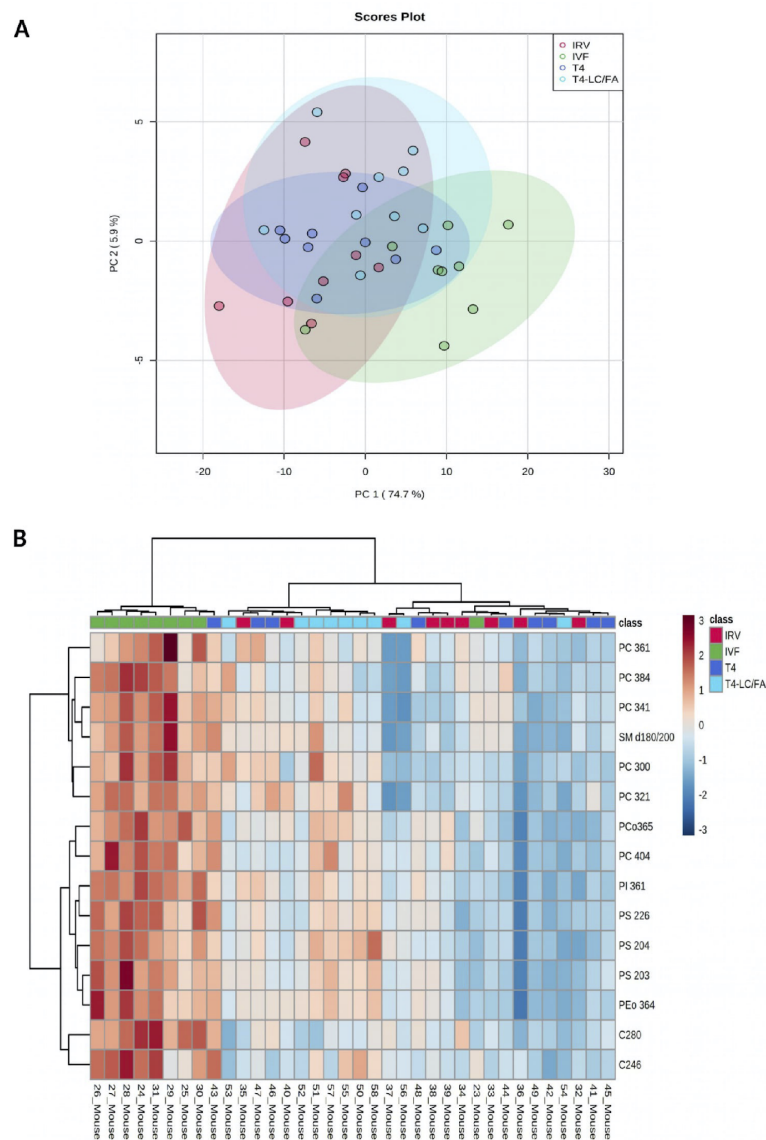
Nota: Distribuição das amostras em um gráfico de pontuação 2D após análise de PCA de 90 características selecionadas por ANOVA mostrando uma maior separação do grupo FIV em relação aos grupos vitrificados (A). Heat map resultante da análise de agrupamento hierárquico dos 15 principais recursos selecionados por ANOVA mostrando a agregação quase completa de amostras do grupo FIV e sua provável proximidade com o grupo T4-LC/FA, sugerindo que este último foi menos afetado por alterações no perfil lipídico após o processo de vitrificação (B). Fold change > 1,5x mostrando lipídios regulados positivamente e regulados negativamente (C). Lipídios significativos selecionados por Volcano plot com limiar de fold change (x) 1,5 (D).

5.11 Efeitos da vitrificação de oócitos e suplementação de meios de vitrificação no perfil lipídico dos blastocistos oriundos de oócitos aquecidos

One-way ANOVA (valor de $p < 0,05$) mostrou que 90 dos 125 lipídios investigados

foram expressos de forma diferente entre embriões de oócitos frescos (FIV) ou vitrificados. Para a PCA realizada com os 90 recursos selecionados, os componentes principais (PCs) 1 e 2 explicaram 80,6% da variância do conjunto de dados e sugeriram uma separação adicional do grupo FIV entre as amostras estudadas (Figura 20-A). A análise de cluster hierárquica dos 15 principais recursos selecionados pela ANOVA agrupou todas as amostras, exceto uma FIV (com exceção da amostra 23); esta análise também sugeriu uma maior proximidade de FIV e T4-LC/FA, como pode ser visto no heat map resultante (Figura 20-B).

Figura 20 - PCA e Heat map de análise de agrupamento hierárquico de MRMs selecionados comparando o grupo de controle de FIV fresco (FIV) e grupos vitrificados usando meios diferentes (IRV, T4 e T4-LC / FA).

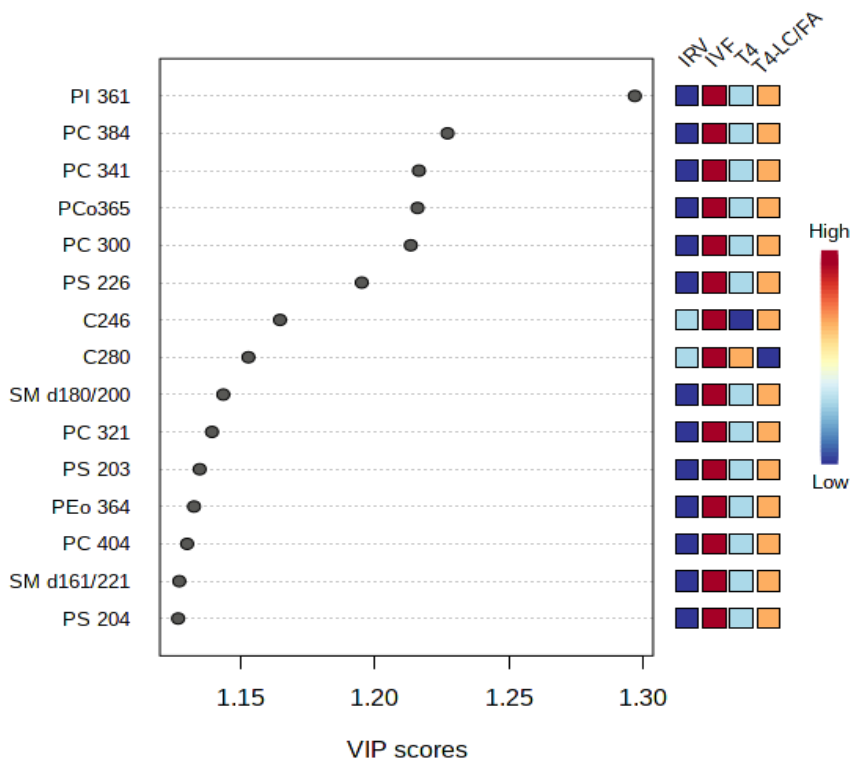


Nota: Distribuição das amostras em um gráfico de pontuação 2D após análise de PCA de 90 características selecionadas por ANOVA mostrando uma maior separação do grupo FIV em relação

aos grupos vitrificados (A). Heat map resultante da análise de agrupamento hierárquico dos 15 principais recursos selecionados por ANOVA mostrando a agregação quase completa de amostras do grupo FIV e sua provável proximidade com o grupo T4-LC/FA, sugerindo que este último foi menos afetado por alterações no perfil lipídico após o processo de vitrificação (B).

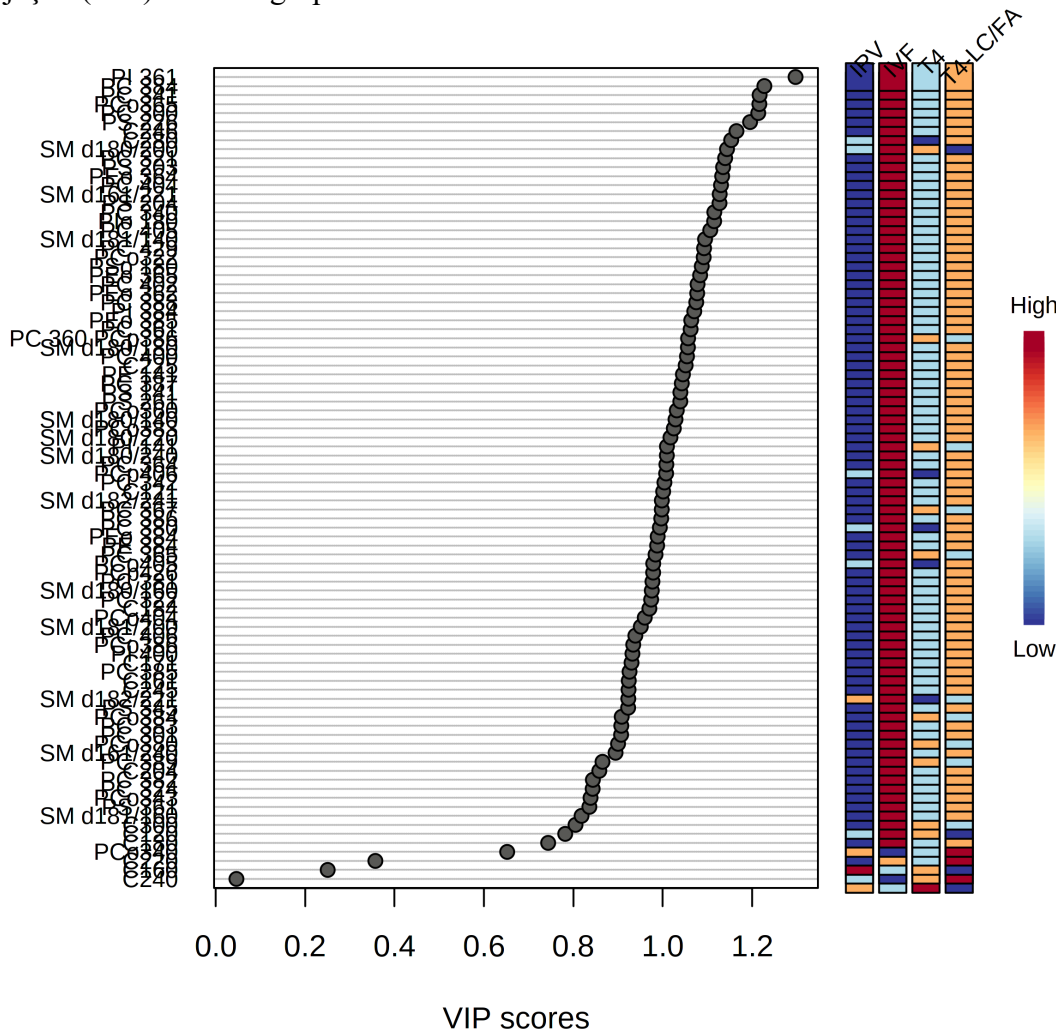
PLS-DA resultou em um gráfico 2D semelhante ao observado após o PCA e VIP score sugeriram a seguinte ordem crescente de grupos em relação à abundância de metabólitos entre as amostras: IRV <T4 <T4-LC / FA <FIV. Esse padrão foi observado em 13 dos 15 principais recursos selecionados por escores VIP (VIP>1) (Figura 21), bem como entre todos os 90 recursos estudados, com poucas exceções (Figura 22).

Figura 21 - As 15 principais variáveis PLS-DA de importância para as pontuações de projeção (VIP) entre os grupos de FIV e vitrificados.



Nota: As caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas do metabólito correspondente, indicando que a abundância do metabólito tinha os seguintes grupos de ordem crescente: IRV <T4 <T4-LC / FA <FIV.

Figura 22 - As 90 principais variáveis PLS-DA de importância para as pontuações de projeção (VIP) entre os grupos FIV e vitrificados.

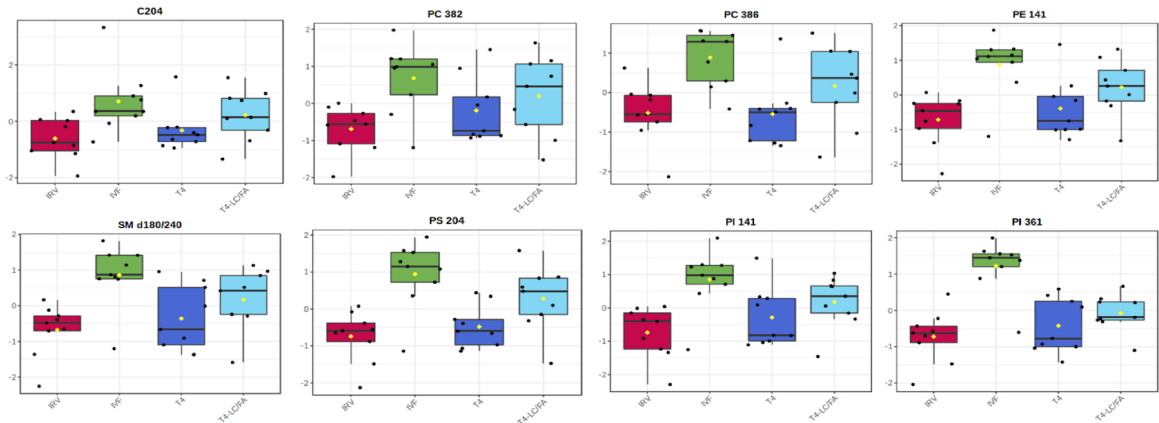


Nota: As caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas do metabólito correspondente, indicando a abundância do metabólito.

A Figura 23 mostra alguns lipídios importantes, incluindo AGLs, lipídios de sinalização e de membrana indicados por ANOVA como discriminante entre os grupos FIV, T4 e IRV, e um perfil lipídico menos perturbado ao comparar blastocistos de FIV (oócitos frescos, não vitrificados) e grupos T4-LC/FA. A comparação de dois a dois grupos entre os grupos FIV e vitrificados usando Volcano plot (limiar de alteração de 2x e valor $p < 0,05$) não detectou características significativas na comparação entre FIV vs. T4-LC/FA e entre FIV vs. T4. Um único lípido foi detectado na comparação entre FIV vs. IRV (PC 34: 1, alteração de vezes = 2,1138 e valor p ajustado = 0,0010487). Por outro lado, as mesmas análises por Volcano plot usando variação de 1,5x como limite e valor de $p < 0,05$, detectaram 12, 17 e 55 lipídios diferentemente representados entre FIV vs. T4-LC / FA, FIV vs. T4 e grupos FIV vs.

IRV, respectivamente (Figura 23; Tabelas 4 - 6).

Figura 23 - Alguns dos lipídios detectados em blastocistos murinos por ANOVA unilateral como discriminante entre controle fresco (FIV) e grupos vitrificados (IRV, T4, T4-LC / FA).



Nota: Não foram observadas diferenças significativas nesses lipídios (ácidos graxos livres, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomiéline, fosfatidilserina e fosfatidilinositol) entre FIV e T4-LC/FA. Asteriscos significam diferença estatística; Linhas: desvio padrão (\pm SD); Losango amarelo: médias; Linhas horizontais: medianas; Caixas: erro padrão (\pm SE); (a.u. = unidades arbitrárias).

Tabela 4 - Lipídios representados diferentemente entre blastocistos de ciclos de FIV (FIV) ou ciclos vitrificados utilizando meio de vitrificação T4-LC/FA. Volcano plot com fold change (FC) de 1,5x como limite e valor de $p < 0,05$.

Nome	FC	$\log_2(\text{FC})$	P valor bruto	$-\log_{10}(p)$
C280	1,9705	0,97857	5,0434E-5	4,2973
PC 341	1,8245	0,86753	4,1033E-4	3,3869
C300	1,5721	0,65271	0,0011764	2,9294
PC 384	1,6864	0,75395	0,0012794	2,893
SM d180/200	1,5898	0,66883	0,0015551	2,8082
PC 361	1,8142	0,85932	0,0024316	2,6141
SM d182/241	1,5727	0,65322	0,0038153	2,4185
C245	1,7882	0,83853	0,0046798	2,3298
SM d180/220	1,6636	0,73428	0,006397	2,194
PS 344	1,536	0,61916	0,01507	1,8219
PC 301	1,561	0,6425	0,020429	1,6898
SM d181/160	1,5896	0,66867	0,036024	1,4434

Tabela 5 - Lipídios representados de forma diferente entre blastocistos de ciclos de FIV (FIV) ou grupos de ciclos vitrificados usando meio de vitrificação T4 usando Volcano plot com fold change (FC) de 1,5x como limite e valor $p < 0,05$.

Nome	FC	log2(FC)	P valor bruto	-log10(p)
PC 384	1,6866	0,75414	2,4305E-4	3,6143
PI 361	1,5348	0,61809	2,6506E-4	3,5767
PC 341	1,8897	0,91816	2,8352E-4	3,5474
PC 364	1,6618	0,73271	4,2698E-4	3,3696
PC 365	1,551	0,63317	6,3058E-4	3,2003
SM d180/200	1,6646	0,73515	9,111E-4	3,0404
C280	1,609	0,68616	9,3124E-4	3,0309
PC 300	1,5315	0,61492	0,001111	2,9543
C245	1,8797	0,91053	0,0016121	2,7926
PC 404	1,5359	0,61906	0,0024057	2,6188
PC 342	1,5632	0,64454	0,0026883	2,5705
PC 360 PCp386	1,512	0,5965	0,0030341	2,518
SM d181/200	1,5932	0,67194	0,0035077	2,455
PC 340	1,5182	0,60237	0,0035487	2,4499
PC 361	1,6648	0,73536	0,0060494	2,2183
SM d182/241	1,5163	0,60056	0,010708	1,9703
SM d180/220	1,5835	0,66314	0,011297	1,947

Tabela 6 - Lipídios representados de forma diferente em blastocistos de ciclos de FIV (FIV) ou grupos de ciclos vitrificados usando meio de vitrificação IRV. Volcano plot com fold change (FC) de 1,5x como limiar e valor de $p < 0,05$.

Nome	FC	log2(FC)	P valor bruto	-log10(p)
PC 341	0,47309	-1,0798	2,3303E-5	4,6326
PI 361	0,58847	-0,76497	3,6719E-5	4,4351
PC 384	0,50602	-0,98273	4,0116E-5	4,3967

(continua)

Nome	FC	log2(FC)	P valor bruto	-log10(p)
PC 321	0,54618	-0,87256	4,1214E-5	4,385
PC 300	0,55855	-0,84023	4,1949E-5	4,3773
PC 340	0,58914	-0,76331	6,1411E-5	4,2118
PCo365	0,65535	-0,60966	9,9521E-5	4,0021
SM d180/200	0,54397	-0,8784	1,0747E-4	3,9687
SM d161/221	0,64695	-0,62826	1,6211E-4	3,7902
C280	0,56164	-0,83229	2,4631E-4	3,6085
PS 226	0,61302	-0,70598	2,5831E-4	3,5879
PE 384	0,61642	-0,69801	2,5946E-4	3,5859
PC 405	0,61907	-0,69182	4,0419E-4	3,3934
PC 360 PCp386	0,64715	-0,62783	4,153E-4	3,3816
PS 204	0,60912	-0,7152	4,303E-4	3,3662
PCo322	0,64263	-0,63794	4,4391E-4	3,3527
SM d180/180	0,61712	-0,69638	4,4454E-4	3,3521
PC 404	0,61763	-0,6952	5,798E-4	3,2367
PC 429	0,63571	-0,65355	5,9564E-4	3,225
PE 141	0,65623	-0,60773	7,0331E-4	3,1529
PEo 364	0,64301	-0,63709	7,7222E-4	3,1123
PEo 385	0,6666	-0,58512	7,8869E-4	3,1031
PIo 180	0,65656	-0,607	7,9849E-4	3,0977
PC 342	0,58529	-0,77278	9,1158E-4	3,0402
PCo383	0,65367	-0,61337	9,1601E-4	3,0381
PC 387	0,66129	-0,59665	9,1948E-4	3,0365
PC 388	0,66634	-0,58568	9,4117E-4	3,0263
PS 203	0,64437	-0,63403	0,0010119	2,9949
PI 141	0,65988	-0,59972	0,0010928	2,9614
C225	0,65986	-0,59977	0,001118	2,9516
SM d180/160	0,62514	-0,67775	0,0012237	2,9123
SM d180/220	0,54165	-0,88455	0,0014624	2,8349
PCo360	0,6615	-0,59618	0,0014743	2,8314
PC 361	0,50511	-0,98532	0,0015055	2,8223
SM d180/140	0,66033	-0,59874	0,0015372	2,8133
PEo 365	0,66583	-0,58678	0,0017579	2,755
PC 364	0,61022	-0,71259	0,0018841	2,7249

(continua)

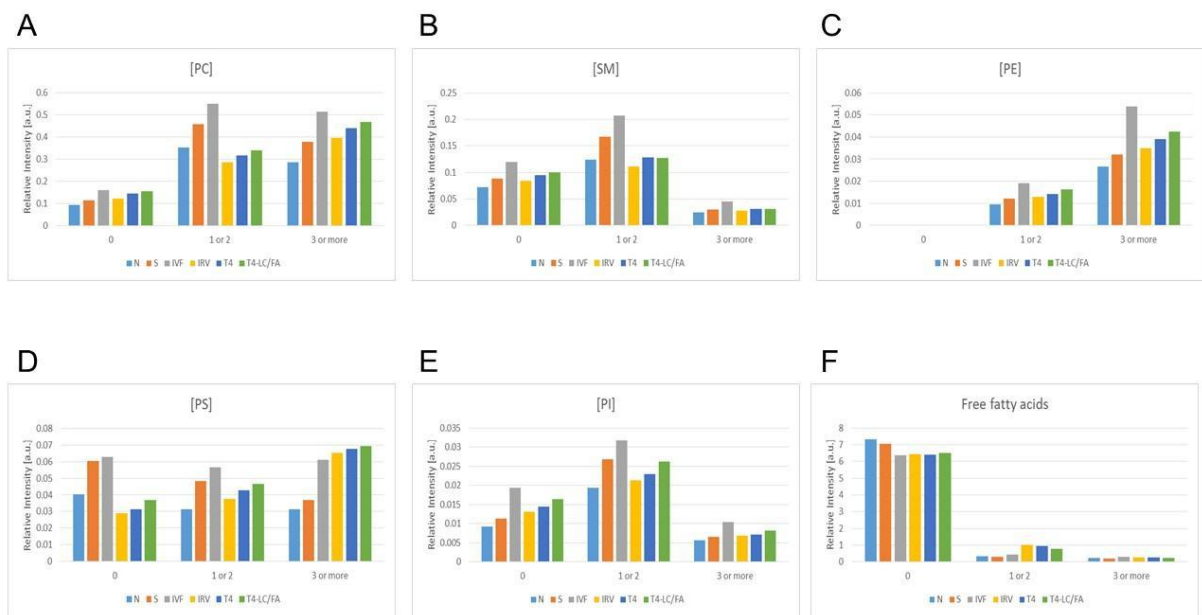
Nome	FC	log2(FC)	P valor bruto	-log10(p)
C161	0,66385	-0,59108	0,001959	2,708
PC 322	0,64924	-0,62317	0,0020452	2,6893
C121	0,65593	-0,60839	0,002055	2,6872
SM d182/241	0,59914	-0,73903	0,0023183	2,6348
PC 382	0,63482	-0,65558	0,002325	2,6336
PC 406	0,62656	-0,67447	0,0024704	2,6072
SM d182/221	0,63761	-0,64925	0,0028467	2,5457
SM d161/240	0,60262	-0,73068	0,003571	2,4472
PC 383	0,63963	-0,6447	0,0038081	2,4193
SM d181/200	0,62483	-0,67847	0,0065578	2,1832
PC 385	0,60416	-0,72699	0,0070438	2,1522
PC 301	0,56137	-0,83297	0,0076752	2,1149
C204	0,62953	-0,66764	0,010163	1,993
PC 320	0,62318	-0,68227	0,010343	1,9853
C171	0,6528	-0,6153	0,015421	1,8119
SM d181/160	0,53771	-0,89511	0,015715	1,8037
PC 362	0,65271	-0,61549	0,022401	1,6497
C245	0,66211	-0,59486	0,029959	1,5235

5.12 Perfil lipídico de blastocistos gerados após diferentes procedimentos de TRA de acordo com o comprimento da cadeia ou grau de insaturação de ácidos graxos

Fosfolípidios (PL) saturados de fosfatidilcolina (PC), esfingomielina (SM), fosfatidilserina (PS) e fosfatidilinositol (PI) foram mais abundantes no grupo de FIV (Fig. 24), com um aumento notável na intensidade relativa de PS de cadeia mais curta e saturado em blastocistos nos grupos S e FIV em comparação com o grupo de acasalamento natural N (Fig. 24D e 25D). Um aumento gradual na intensidade iônica relativa das espécies PC e SM foi observado entre N, S e FIV, seguido por uma redução nos grupos vitrificados; este efeito é especialmente pronunciado em PC e SM com uma ou duas insaturações (Fig. 24-A e B). Notavelmente, os AGLs mostraram um padrão completamente diferente, com uma redução nos grupos S e FIV em comparação com o N nas espécies saturadas e de cadeia mais longa, e um aumento nos grupos vitrificados quando comparados à FIV nas espécies de cadeia média e

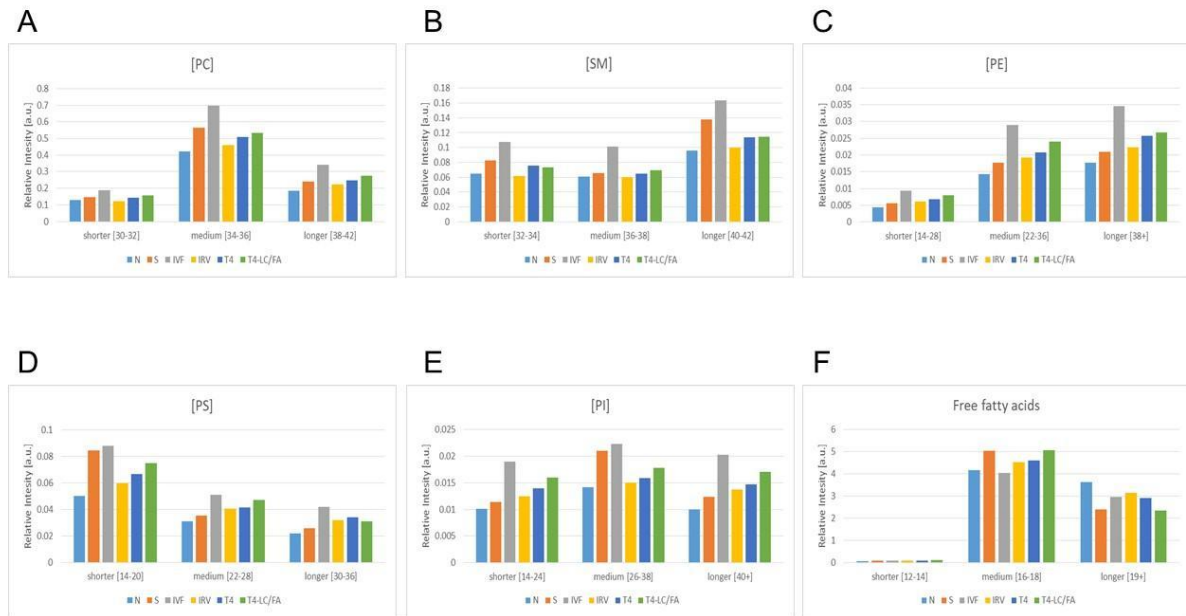
insaturadas (Fig. 24F e 25F). Notavelmente, os PS contendo 3 ou mais insaturações mostraram um aumento acentuado em comparação aos grupos N e S, e foram os únicos PL não reduzidos nos grupos de vitrificação quando comparados à FIV (Fig. 24 D).

Figura 24 - Soma das intensidades relativas de íons nas diferentes classes de lipídeos perfiladas neste estudo para os diferentes grupos (N, S, FIV, IRV, T4 e T4-LC / FA).



Nota : A classificação foi realizada de acordo com o nível de saturação dos resíduos de acila graxos (número de ligações duplas) em 0 (saturado), 1 ou 2 (insaturado) e 3 ou mais (altamente ou poliinsaturado). Os valores da intensidade relativa do íon são apresentados em unidades arbitrárias (a. U.).

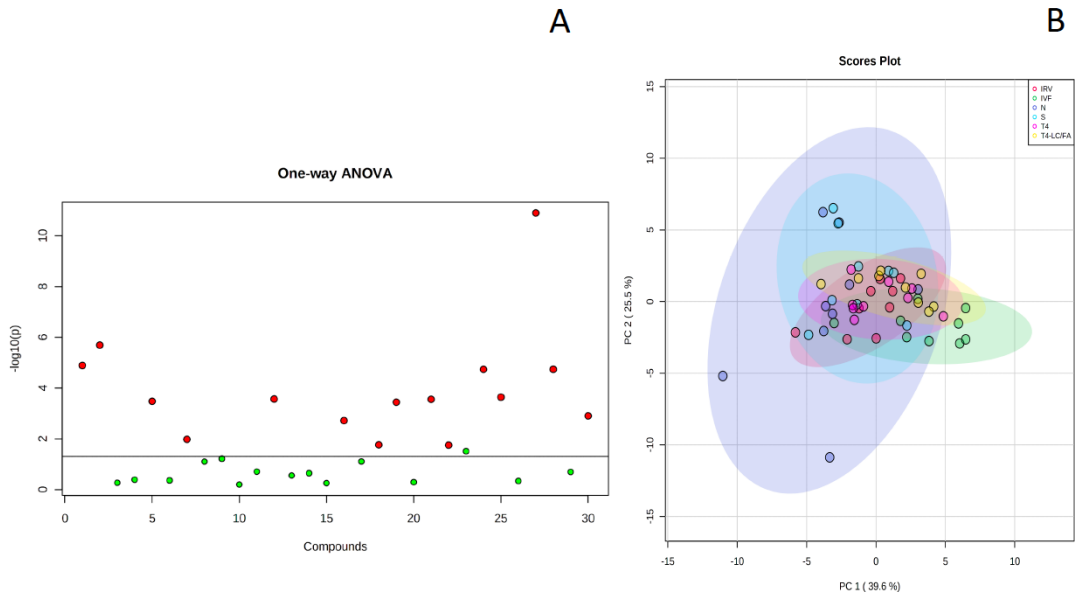
Figura 25 - Soma das intensidades relativas de íons nas classes de lipídeos perfiladas neste estudo para os diferentes grupos (N, S, FIV, IRV, T4 e T4-LC / FA) de acordo com o comprimento da cadeia de carbono



Nota: A classificação de mais curto, médio e mais longo variou para cada classe, uma vez que consideramos as espécies de lipídios perfiladas em nossa análise e a variação do comprimento da cadeia existente dentro de cada classe, então a dividimos em três categorias. O número de carbonos em cada categoria encontra-se entre parênteses. Os valores da intensidade relativa do íon são apresentados em unidades arbitrárias (a. U.).

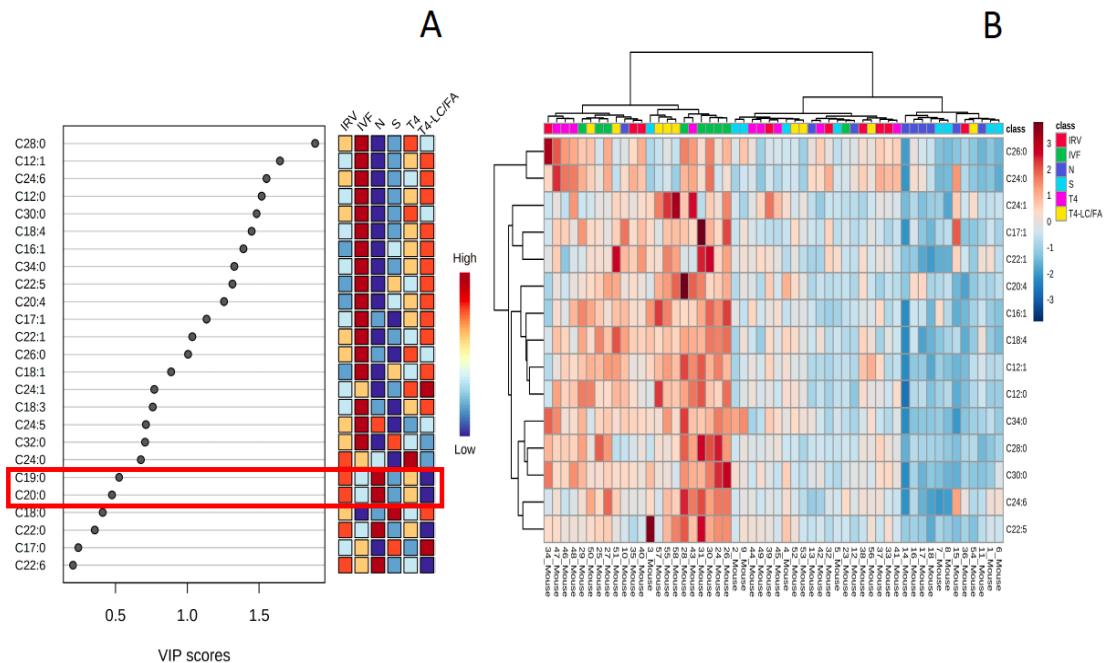
Uma investigação mais aprofundada de AGL usando a análise ANOVA mostrou que 15 dos 30 ácidos graxos livres significativos investigados foram expressos de forma diferente entre os blastocistos dos grupos N, S, FIV e vitrificados (p -valor $<0,05$) (Fig. 26A). A análise de PCA das características selecionadas por ANOVA não mostrou uma maior separação entre N, S, FIV e grupos vitrificados (ver fig. 26B), e apenas os ácidos graxos de cadeia longa (C19:0) e (C20:0) apresentou um padrão de abundância de metabólitos semelhante ao observado na soma da análise de intensidade relativa, de acordo com os escores PLS-DA VIP (Fig. 27A). Os 25 principais recursos selecionados pela análise One-way ANOVA em cada grupo são mostrados no heat map (Fig. 27B).

Figura 26 - Análise de ácidos graxos livres entre os grupos N, S, FIV e vitrificados.



Nota: Gráfico de ANOVA com valor p limiar de 0,05. B mostrando 15 dos 30 ácidos graxos livres significativos (A). A análise de PCA das características selecionadas por ANOVA não mostrou uma maior separação entre os grupos N, S, FIV e vitrificados (B).

Figura 27 - As 25 principais variáveis PLS-DA de importância para as pontuações de projeção (VIP) entre N, S, FIV e grupos vitrificados.



Nota: (A). Heat map resultante da análise de agrupamento hierárquico dos 15 principais recursos selecionados por ANOVA (B). As caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas do metabólito correspondente, indicando a abundância do metabólito.

6 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou inicialmente os efeitos do tempo de equilíbrio durante o protocolo de vitrificação e o impacto de um novo meio de vitrificação suplementado com ácidos graxos insaturados e L-carnitina no desenvolvimento embrionário *in vitro* e no perfil lipídico da membrana de oócitos de camundongos C57BL/6J. No geral, o protocolo de equilíbrio longo foi associado à menor sobrevivência oocitária, menores taxas de formação de blastocistos, e alterações morfológicas na superfície dos oócitos semelhantes a bolhas, diferindo entre as composições de ES. Embora sem diferença significativa no desenvolvimento embrionário entre IRV, T4 e T4-LC/FA, observou-se alterações nos lipídios de membrana dos oócitos expostos ao tempo mais longo de equilíbrio em oócitos IRV. Notavelmente, fase longa de equilíbrio em oócitos de IRV foi relacionado a redução de abundância relativa de lipídios estruturais correlacionado a presença maciça de bolhas. A análise multivariada por PCA consiste em um método não supervisionado e detectou claramente, a separação entre os grupos IRV-7MIN (ES7; cor verde) e IRV-10MIN (ES10; cor vermelha). Além disso, o Volcano plot indicou os lipídios que foram significativamente modificados pelos tempos de equilíbrio (alta e baixa abundância relativa), e é possível observar a separação clara das amostras de acordo com a concentração relativa de lipídios no Heatmap.

Os 25 principais compostos correlacionados com bolhas incluíram 11 fosfolipídios estruturais regulados negativamente (PC e SM) e 13 lipídios regulados positivamente (PE, PS e AGLs) demonstrando degradação de fosfolipídios de membrana. Além disso, observamos que as vias metabólicas lipídicas em oócitos expostos à fase de equilíbrio da vitrificação estavam conectadas à biossíntese de ácidos graxos insaturados, metabolismo de glicerofosfolipídeos e metabolismo de ácidos graxos polinsaturados. Essa alteração do perfil lipídico mencionado poder ter influenciado o nível de fluidez da membrana do oócito durante a etapa de equilíbrio, gerando bolhas, que precisam ser melhor investigadas.

A análise do perfil lipídico por espectrometria de massas usando abordagem de perfil de MRM (DE LIMA *et al.*, 2018) demonstrou claramente em nosso estudo que os ácidos oléico e linoléico adicionados ao ES foram detectados exclusivamente no grupo T4-LC/FA como parte de um perfil lipídico enriquecido com vários lipídios de membrana, baixa abundância relativa ou ausência de fosfatidilserinas e outros ácidos graxos livres. De fato, os dados não comprovam a incorporação dos ácidos graxos nas membranas do oócito. A internalização poderia ser comprovada utilizando ácidos graxos marcados isotopicamente para

que os compostos adicionados pudessem ser seguidos se internalizados. No entanto, oócitos dos 3 meios de vitrificação (IRV, T4 ou T4-LC/FA) foram submetidos ao mesmo estímulo, mas apenas nos oócitos expostos ao T4-LC/FA os ácidos oleico e linoleico foram detectados como lipídios significativos ($P < 0,05$) por análise de Volcano plot (que combina os pressupostos do teste t e as concentrações absolutas de lipídios). Não consideramos viável a metabolização dos ácidos graxos adicionados aos meios de vitrificação após exposição por alguns minutos sem etapa de cultura subsequente. Assim, considerando as possíveis rotas para os ácidos graxos adicionados ao T4-LC/FA (metabolização ou liberação pelo estímulo) e a possível internalização, acreditamos que esta última é mais plausível se considerarmos que durante o equilíbrio na fase de vitrificação ocorre um intenso fluxo bidirecional de água, agentes crioprotetores e moléculas entre os ambientes intra e extracelular. A formulação do meio T4 é a mesma do T4-LC/FA, exceto pela inclusão de L-carnitina e espécies lipídicas [(ácido oleico (ácido cis-9-octadecenoico 18:1) e ácido linoleico (18:2 (n- 6), ácidos 9,12-octadecadienoicos) no meio de vitrificação.

No entanto, em nossas condições experimentais, nenhum benefício da adição desses ácidos graxos às soluções de vitrificação e aquecimento foi detectado no desenvolvimento embrionário avaliado pelas taxas de formação de blastocistos em D4 e taxas cumulativas (D4+D5), embora estudo anterior de nosso grupo de pesquisa tenha mostrado que o tratamento de oócitos durante as etapas de vitrificação e aquecimento com ácidos oleico e linoléico combinados com L-carnitina melhorou o número de células da massa celular interna nos blastocistos (VIANA *et al.*, 2018) indicando o potencial desta estratégia para melhorar os resultados de vitrificação. Além disso, em estudo recente, a suplementação de ácidos graxos nas soluções de aquecimento melhorou a percentagem massa celular interna e trofocotoderma grau A de embriões humanos vitrificados em clivagem comparado ao grupo sem suplementação de ácidos graxos (OHATA *et al.*, 2021).

Os ácidos graxos são os constituintes da cauda hidrofóbica dos glicerofosfolipídios que formam as membranas celulares, e no meio de cultura celular podem ser incorporados aos fosfolipídios da membrana ou atuar como ativadores de membrana e/ou substratos oxidativos no citoplasma para estimular as vias biossintéticas dos fosfolipídios (PELECH *et al.*, 1984; PELECH *et al.*, 1983) e fosforilação oxidativa mitocondrial para gerar ATP (ROHRBACH, 2009; STANLEY *et al.*, 2012). Os ácidos graxos poliinsaturados, portanto, influenciam aspectos-chave da fisiologia celular, como fluidez da membrana (SCHUMANN, 2016), metabolismo (ROHRBACH, 2009; STANLEY *et al.*, 2012), dobramento e funcionalidade de proteínas (BOLAND *et al.*, 2008), carregadores lipídicos (SHAIKH *et al.*, 2015) e sinalização

(HOU *et al.*, 2016; OUELLETTE *et al.*, 2019). Por outro lado, os papéis potenciais dos ácidos graxos adicionados às soluções de vitrificação na função oocitária são desconhecidos. Semelhante aos resultados do perfil lipídico obtidos neste estudo, os resultados do desenvolvimento embrionário variaram de acordo com a composição do ES e o tempo de equilíbrio. Ao comparar as composições de ES, nosso principal achado foi que a taxa de fertilização de oócitos equilibrados no meio T4-LC/FA não diferem de suas contrapartes frescas, independentemente da duração do equilíbrio, sugerindo um efeito positivo dos ácidos graxos combinados com L-carnitina na membrana do oócito que favoreceu a fertilização *in vitro*. Além disso, as taxas cumulativas de blastocistos de oócitos expostos a protocolos de equilíbrio curto ou longo em meio T4-LC/FA (42,42% vs. 54,05%) não diminuíram conforme observado em T4 (78,12% vs. 50%) e IRV (61,54% vs. 34,37%), respectivamente, que pode ter sido um efeito potencial dos ácidos graxos combinados com L-carnitina para neutralizar o efeito do longo período de equilíbrio. Também pode sugerir que o protocolo de equilíbrio curto pode ser insuficiente para o oócito atingir o equilíbrio osmótico no ES suplementado com esses lipídios uma vez que o tempo longo de equilíbrio não afetou negativamente este grupo. Além disso, o meio T4-LC/FA é um meio mais viscoso que os meios T4 e IRV..

Conseqüentemente, as taxas cumulativas de blastocistos de oócitos T4/LC-FA expostos a equilíbrio curto (ES-7MIN) foram significativamente menores em comparação com o meio T4 (42,42% vs. 78,12%, respectivamente). Parece que nesta solução de equilíbrio à base de lipídios, o equilíbrio osmótico do oócito ocorre mais lentamente e precisa de mais tempo para ser atingido. Assim, será interessante avaliar em futuros estudos tempos de equilíbrio mais longos utilizando o meio T4-LC/FA. A hipótese de que ácidos graxos adicionados ao ES podem contribuir para modular as propriedades da membrana celular como permeabilidade e resistência à toxicidade crioprotetora e/ou estresse osmótico durante maior exposição ao ES é particularmente relevante e merece ser investigada. Conforme relatado em um estudo retrospectivo incluindo 192 blastocistos de 167 pacientes, a exposição prolongada à etapa de equilíbrio utilizando soluções baseadas em EG/DMSO durante a vitrificação de blastocistos humanos pode ser prejudicial ao potencial de desenvolvimento do embrião, enquanto uma exposição mais curta pode afetar a penetração de crioprotetores em blastômeros (MITSUHATA *et al.*, 2020).

Atualmente, não existe um protocolo universal de vitrificação de oócitos humanos. O tempo de exposição dos oócitos em ES pode variar de 10 a 15 minutos de acordo com as recomendações dos fabricantes dos meios de vitrificação (COBO *et al.*, 2008; KUWAYAMA *et al.*, 2005; MAGNUSSON *et al.*, 2008). Os padrões repetidos de alterações morfológicas

oocitárias semelhantes a bolhas observados em várias replicatas experimentais neste estudo, predominantemente em IRV e, em menor grau, em oócitos T4, motivaram a análise subsequente do perfil lipídico e fosfolipídico, de modo a compreender este efeito adverso induzido pelo protocolo recomendado pelo fabricante (ES-10MIN), bem como entender porque esse fenômeno não ocorreu em oócitos equilibrados em meio T4-LC/FA. Nossas análises revelaram perfis lipídicos oocitários distintos entre os meios IRV, T4 e T4-LC/FA e entre oócitos IRV expostos a ES-7MIN ou ES-10MIN. Além disso, bolhas em oócitos equilibrados em IRV por 10 minutos foram correlacionadas com a regulação negativa de fosfolipídios estruturais e a regulação positiva de fosfatidilserinas e ácidos graxos livres (ver Figura 11). Por outro lado, o equilíbrio do oócito em meio T4-LC/FA por 10 minutos (ES-10MIN) resultou na possível incorporação de ácidos oleico (18:1) e linoléico (18:2) na membrana do oócito, e maior abundância relativa do PC (38:8) e outros PC e SM poliinsaturados, em comparação com oócitos frescos (CTR) ou vitrificados em IRV e T4.

Estudos *in vitro* mostram que o tratamento de hepatócitos de rato ou células HeLa com ativadores de membrana, como ácido oleico, resultaram na translocação de CTP localizado no núcleo: fosfocolina citidililtransferase (PCYT1A) para a membrana nuclear e PCYT1A citoplasmático para o retículo endoplasmático, que por sua vez resultou no aumento da taxa de síntese de PC (PELECH *et al.*, 1984; PELECH *et al.*, 1983). A suplementação de ES com ácidos oleico e linoléico na presença de L-carnitina provavelmente aumentou a fração desses fosfolipídios contendo poliinsaturados.

Curiosamente, o perfil lipídico em T4 apresentou poucas alterações em comparação aos T4-LC/FA, indicando que a trealose e/ou outros componentes do meio T4 também contribuíram para estabilizar a bicamada lipídica da membrana. As diferenças encontradas entre oócitos T4 e T4-LC/FA expostos ao ES-10MIN compreendem dois lipídios com alta abundância relativa em T4-LC/FA: ácido oleico (C18:1) e ácido linoléico (C18:2). Assim, pelo menos em parte, podemos inferir que os ácidos graxos e a L-carnitina presentes no meio T4-LC-FA contribuíram para taxas de fertilização semelhantes aos oócitos frescos, evitando as mencionadas alterações morfológicas (bolhas) e distúrbios da membrana lipídica induzidos pela exposição prolongada às soluções de equilíbrio conforme observado no IRV.

Quando os tempos de equilíbrio foram comparados em T4 ou T4/LC-FA (comparação intra-grupo), apenas pequenas diferenças foram observadas. Em relação ao meio T4, 2 fosfolipídios discriminaram entre o equilíbrio oocitário em 7 minutos ou 10 minutos, o PC (40:5) e o SM (18:14:0), enquanto o PEO (40:0) discriminou em oócitos T4-LC/FA. Inversamente, 12 lipídios discriminantes foram detectados em oócitos de IRV, com maior

abundância relativa de fosfolipídios ou AGL associados aos protocolos ES-7MIN ou ES-10MIN, respectivamente. Portanto, os oócitos IRV submetidos a longo protocolo de equilíbrio apresentaram um conteúdo significativamente inferior de fosfolipídios de membrana. Hotamisligil et al. mostraram que em exposição prolongada (>5min) a altas concentrações de EG (>4M) durante a etapa de equilíbrio, bolhas na membrana foram observadas em oócitos de camundongos e a distribuição de microfilamentos foi alterada (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996). Neste experimento de perfil lipídico oocitário, os oócitos foram submetidos apenas à fase de equilíbrio sem sofrer mudanças de temperatura, então parece que as vesículas observadas na superfície do oócito podem estar ligadas a uma permeabilização excessiva da membrana induzida por um ou mais componentes do ES. No entanto necessita-se de outros estudos, utilizando metodologias adequadas para avaliação da permeabilização da membrana, para confirmar estes achados.

É importante notar que as alterações observadas na superfície dos oócitos de IRV e T4 não comprometeram as taxas de sobrevivência e fertilização, mas um desenvolvimento embrionário baixo de oócitos de IRV foi observado. Embora nenhuma diferença estatística tenha sido observada, os oócitos equilibrados por 10 minutos nos meios T4 e T4-LC/FA originaram 50% mais embriões em comparação ao grupo IRV (18,75%, 18,92% e 9,38%, respectivamente). É importante notar que conduzimos um ensaio de embrião de camundongo (MEA), um teste amplamente utilizado na indústria de fertilização *in vitro* para verificar a segurança de produtos para TRA. Assim, a segurança de oócitos humanos expostos a longos protocolos de equilíbrio deve ser considerada, uma vez que tanto o desenvolvimento embrionário quanto o perfil lipídico foram comprometidos em nosso estudo.

As funções das membranas celulares não se limitam a barreiras passivas. Propriedades físico-químicas como a viscosidade da membrana e a permeabilidade determinam a difusividade da proteína e regulam a difusão de solutos para dentro e fora do citosol, respectivamente (LEVENTAL *et al.*, 2020). Além disso, aproximadamente um terço de todas as proteínas estão embutidas na membrana e muito mais proteínas estão associadas à membrana por meio de modificações pós-tradução, ligação de lipídios e interações proteína-proteína (LEVENTAL *et al.*, 2020). Portanto, é importante ter em mente que o impacto da vitrificação nas propriedades da membrana oocitária é complexo, e as consequências dos distúrbios da membrana na sinalização celular e no metabolismo precisam de atenção. Adicionalmente, algumas considerações importantes podem ser levadas em conta com relação a esses achados: 1) um ou mais componentes da solução de equilíbrio de IRV tiveram um impacto negativo na membrana do oócito de camundongo; 2) o protocolo de equilíbrio longo

pode ser mais propenso a induzir distúrbios na membrana celular devido ao tempo de exposição aos crioprotetores, à toxicidade dos crioprotetores e ao estresse osmótico; 3) ácidos graxos em meio T4-LC/FA podem ter modulado a permeabilidade da membrana do oócito e/ou neutralizado a toxicidade dos crioprotetores, evitando desidratação excessiva ou permeabilização da membrana e danos na bicamada lipídica; 4) a trealose utilizada na formulação de Tvitri-4 foi mais eficiente para estabilizar a bicamada lipídica da membrana e/ou aumentar a temperatura de transição vítrea em comparação com a sacarose utilizada como crioprotetor não-permeante no meio de vitrificação Irvine. Foi sugerido anteriormente que a trealose parece ter um papel importante na prevenção da fusão da membrana e agregação de partículas intramembranas e também estabilizando bicamadas durante estados de água reduzidos (ISHIDA *et al.*, 1997; RUDOLPH *et al.*, 1985).

Em relação ao perfil lipídico de oócitos expostos a ES-7MIN, o gráfico de One-way ANOVA e Volcano Plot indicaram consistentemente uma abundância relativa mais alta de PC (38:8) (fold change = 13; $p=0.000209$) e outras espécies de PC em oócitos equilibrados em meio T4-LC/FA, bem como em oócitos CTR (não expostos a ES), enquanto em oócitos IRV este PC foi regulado negativamente e uma regulação positiva de PEO (36:1) foi evidente (Fold change = 12,46). Assim como a membrana plasmática, o PC e o PE são os principais fosfolipídios na membrana mitocondrial externa e contêm um grupo de cabeça com carga neutra. A depleção de PE causa acúmulo de PC e vice-versa, apontando para papéis estruturais e funcionais semelhantes de ambos os fosfolipídios (BECKER *et al.*, 2013). Assim, parece que esses PE ligados a éter podem ser candidatos a lipídios biomarcadores de depleção de PC e/ou adaptação celular ao equilíbrio osmótico durante a vitrificação, o que ainda precisa ser melhor investigado.

Em relação ao perfil lipídico dos blastocistos, estes foram afetados por diferentes procedimentos de reprodução assistida, incluindo estimulação ovariana, FIV e vitrificação de oócitos. A estimulação ovariana sozinha ou em associação com a fertilização *in vitro* promoveu um acúmulo geral de lipídios nos blastocistos; enquanto a vitrificação resultou em uma abundância relativa reduzida de fosfolipídios e esfingolipídeos, com exceção de algumas espécies de AGL e fosfatidilserinas altamente insaturadas, em comparação com blastocistos gerados a partir de oócitos frescos (grupo FIV). Além disso, nossos resultados sugerem que os ácidos oleico e linoléico combinados com L-carnitina como suplementos de meios de vitrificação foram internalizados pelos oócitos prevenindo, até certo ponto, alterações no conteúdo de fosfolipídios de blastocistos induzidos pela criopreservação de oócitos, o que necessita de confirmação utilizando metodologias específicas para este fim. Monitoramos

essas mudanças no perfil lipídico em blastocistos únicos utilizando o método de perfilagem *MRM* conforme foi realizado nos oócitos, que é um método que não requer separação cromatográfica e permite a detecção de um maior número de classes lipídicas. A estimulação ovariana por si só promoveu mudanças no perfil de fosfolípidios de blastocistos de camundongos em comparação com suas contrapartes *in vivo* de ciclos naturais, resultando na regulação positiva (alta abundância relativa) de alguns fosfolípidios, incluindo fosfatidilcolina, fosfatidilserina e esfingolipídios, como esfingomielinas. Curiosamente, uma ligeira redução nos AGLs C19:0, C20:0, C21:0, C22:0, C18:2 e C24:5 em paralelo com um aumento da abundância relativa de fosfatidilcolina ligada a éter insaturada foi encontrado no grupo S além da SM saturada d180/220 e da PS 14:1. As espécies comuns de PC indicadas por ANOVA e Volcano plot entre os grupos S e N compreenderam PCo32:2, PCo34:3, PC 36:0 PCo36: 5, PC 38:9.

Neste estudo fornecemos uma caracterização profunda sobre as mudanças nos lipídios estruturais das membranas de blastocistos de camundongos induzidas pela superovulação. Nesse contexto, Wang et al. (WANG *et al.*, 2015) mostraram anteriormente que em embriões de camundongo em estágio de duas células, o tratamento com gonadotrofina exógena aumentou o acúmulo de lipídios e diminuiu a síntese de AGL de uma maneira dose-dependente, sugerindo que a superovulação pode afetar o metabolismo dos lipídios do embrião. Assim, nossos resultados demonstraram abundância relativa reduzida de seis AGL em embriões derivados de ciclos estimulados. Foi demonstrado que as gonadotrofinas podem regular tanto a esteroidogênese quanto a síntese de novo de AG (LIU *et al.*, 2009). Além disso, as gonadotrofinas pertencem à família dos hormônios glicoprotéicos diméricos e regulam a fisiologia gonadal mediada pelos receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (HSUEH *et al.*, 2018). Esses GPCRs controlam uma variedade de processos celulares fundamentais, regulando as vias de sinalização de fosfolípidios (OUDE WEERNINK *et al.*, 2007). As alterações na composição e abundância de lipídios em blastocistos induzidas por superovulação encontradas no presente estudo podem ser usadas como uma base para novos estudos visando investigar os mecanismos por trás dessas mudanças de fosfolípidios, esfingolipídios e AG, e se essas alterações durante o desenvolvimento embrionário inicial podem ter impacto em funções biológicas cruciais da prole proveniente de técnicas de reprodução assistida em médio e longo prazo.

Também observamos que a FIV promoveu mudanças mais extensas no perfil lipídico dos blastocistos, relacionadas ao aumento geral da abundância de vários lipídios da membrana, incluindo PC, PS, PE, PI, SM e AGLs em comparação com blastocistos

produzidos *in vivo* a partir de ciclos superovulados ou naturais. Esses achados podem ser explicados pelo desenvolvimento mais acelerado de embriões produzidos *in vitro*, com aumento do número de células e de suas membranas. No entanto, uma vez que blastocistos produzidos *in vivo* de fêmeas superovuladas também experimentaram um aumento no conteúdo de PL, podemos presumir que a estimulação ovariana contribuiu para esse achado em embriões de FIV. Outra explicação possível é a facilitação da entrada de moléculas lipídicas exógenas do soro para o oócito após a remoção das células do cumulus (denudação do oócito), o que poderia refletir no perfil lipídico dos embriões (LOLICATO *et al.*, 2015). Assim, foi demonstrado que o teor de fosfolipídios de embriões bovinos produzidos *in vitro* variava de acordo com o teor de soro no meio de cultura (VERRUMA *et al.*, 2020). Curiosamente, esses autores demonstraram que os PL identificados em embriões são compatíveis com aqueles encontrados em soro bovino fetal e meio de cultivo, mostrando que outras classes de lipídios além de triacilglicerol e AG podem ser reguladas positivamente em embriões de fertilização *in vitro*. Desta forma, uma combinação do efeito da estimulação ovariana com gonadotrofinas (WANG *et al.*, 2015) e condições de cultivo *in vitro*, como suplementação de proteína e soro nos meios de cultivo (ABE *et al.*, 2002; BARCELÓ-FIMBRES *et al.*, 2011; DEL COLLADO *et al.*, 2015; VIREQUE *et al.*, 2017), possivelmente, resultou na super-representação de PL no grupo de FIV observada no presente estudo. Além disso, a neossíntese de triglicerídeos devido à presença de soro (ABD-EL-RAZEK *et al.*, 2000), ou uma redução na β -oxidação na mitocôndria, pode comprometer a capacidade do embrião de metabolizar lipídios (ABE *et al.*, 2002; CROSIER *et al.*, 2001) e, conseqüentemente, levar a um acúmulo anormal de lipídios saturados e insaturados de cadeia longa no citoplasma que pode prejudicar o desenvolvimento embrionário.

Usando MALDI-MS, Annes *et al.*, mostraram que blastocistos bovinos produzidos *in vitro* têm diferenças substanciais no perfil lipídico em comparação com os frescos (ANNES *et al.*, 2019). O perfil de PC protonada (32:0) e PC sodiada (32:0) ou PC protonada (34:3), PC protonada (34:1) e PC (36:1) foram íons específicos para os grupos *in vitro* sugerindo que o sistema de cultura influencia o metabolismo lipídico, e que o ambiente *in vitro* afetou mais as PC (ANNES *et al.*, 2019). Em nosso estudo, enquanto a FIV promoveu um aumento na abundância de fosfolipídios do embrião, a vitrificação alterou o perfil lipídico dos blastocistos causando uma redução geral na abundância de lipídios da membrana. As quinze principais classes lipídicas reguladas negativamente em blastocistos de oócitos aquecidos-vitrificados em comparação com FIV de oócitos frescos por PLS-DA (VIP > 1,0) foram o fosfatidilinositol PI (36:1), fosfatidilcolinas PC (36:1), PC (38:4), PC (34:1), PC (30:0), PC (32:1), PC (40:0),

PCo (36:5); esfingomielina (SMd18:0/22:0), fosfatidilserinas PS (22:6), PS (20:4), PS (20:3), fosfatidiletanolaminas PEO (36:4) e AGL C(28:0), C(24:6). Este efeito parece ter sido especialmente acentuado nas PC e SM com 1 ou 2 insaturações e PS insaturadas. Foi relatado anteriormente que PL, incluindo PC e SM estão significativamente regulados negativamente em oócitos de camundongos vitrificados-aquecidos em relação aos oócitos frescos (JUNG *et al.*, 2021; JUNG *et al.*, 2014).

Além de sua função estrutural, esses lipídios têm importante papel na sinalização celular, principalmente em eventos como estresse e gravidez. Em mamíferos, lipídios colina e etanolamina são os principais componentes estruturais das membranas celulares e influenciam a fluidez da membrana e a troca iônica, bem como a sinalização apoptótica (VAN MEER *et al.*, 2008), enquanto as esfingomielinas estão associadas à supressão da apoptose (HANNUN *et al.*, 2002) e poderiam auxiliar a organização nuclear durante a divisão celular (ALBI *et al.*, 2004).

Observamos também que a vitrificação promoveu redução de PI (DI PAOLO *et al.*, 2006) e PE (BURNUM *et al.*, 2009), ambos importantes para a sinalização celular; além de PC, PS e AGL. Em uma análise geral, o padrão de abundância de metabólitos (de acordo com pontuações VIP, uma medida da importância de uma variável no modelo PLS-DA) foi IRV <T4 <T4-LC/FA <IVF, com T4-LC/FA sendo o grupo mais perto de IVF (grupo fresco). Além disso, enquanto nenhuma característica significativa na comparação dois a dois foi detectada entre FIV e T4-LC/FA, e FIV e T4, um único lipídio foi detectado entre FIV e IRV (PC 34:1). O fosfolipídio PC (34:1) foi o lipídio mais afetado no grupo IRV, assim como em um estudo anterior que também identificou esse lipídio como um potencial biomarcador negativo de sobrevida de embriões bovinos após criopreservação (LEÃO *et al.*, 2017; SUDANO *et al.*, 2012) com diminuição da abundância relativa após vitrificação-aquecimento.

As mudanças na abundância de lipídios podem refletir o grau de estresse físico e bioquímico que a célula sofre durante a criopreservação. Estudos *in vitro* anteriores focados em tempos mais longos de exposição de oócitos e embriões aos AG durante a maturação *in vitro* ou cultivo de embriões sugeriram que o AG extracelular pode ser usado como um substrato energético (AIZAWA *et al.*, 2019; STURMEY *et al.*, 2009). Além disso, a suplementação *in vitro* com AG insaturados (como ácido linoléico) durante a maturação *in vitro* ou cultivo de embriões produziu efeitos positivos principalmente na maturação de oócitos bovinos, taxas de desenvolvimento de blastocistos e tolerância à criopreservação (AARDEMA *et al.*, 2011; MAREI *et al.*, 2010; SHEHAB-EL-DEEN *et al.*, 2009) aumentando a fluidez da membrana (HOCHI *et al.*, 1999; LEÃO *et al.*, 2015). Logsdon e

colaboradores demonstraram que a adição de carnitina, como um co-fator necessário para a oxidação de AG, melhorou significativamente o desenvolvimento de embriões murinos quando adicionado a um meio de cultura contendo albumina com níveis relativamente elevados de AGs (LOGSDON *et al.*, 2021).

Como mostrado em nosso estudo, a presença de AGs insaturados e L-carnitina em meios de vitrificação parece ajudar a estabilizar a membrana, mantendo o perfil lipídico de embriões derivados de oócitos expostos a essas soluções à base de lipídios durante a vitrificação mais semelhante ao de blastocistos de FIV utilizando oócitos frescos. Curiosamente, de acordo com nossos achados, o tratamento de oócitos durante as etapas de equilíbrio e vitrificação evitou, até certo ponto, alterações lipídicas em estágios posteriores do desenvolvimento embrionário, demonstrando que mesmo o curto tempo de exposição durante a vitrificação a soluções contendo LC e AG são suficientes induzir alterações no perfil lipídico. Futuros estudos são ainda necessários para testar se a suplementação do meio de cultivo durante outras etapas das TRA com AG insaturados e LC poderiam também contribuir para evitar distúrbios no perfil de fosfolipídios da membrana durante o processo de fertilização *in vitro* e cultivo de embriões, além da vitrificação.

Nosso estudo tem limitações óbvias. O pequeno tamanho amostral do estudo pode ter prejudicado nossa capacidade de detectar diferenças estatisticamente significativas nos resultados de embriogênese entre os grupos utilizando oócitos vitrificados, limitando a interpretação do efeito da suplementação do meio de vitrificação. Além disso, existe uma falta de estudos focados no impacto do tempo de equilíbrio da vitrificação no perfil lipídico da membrana do oócito para nos ajudar a discutir os resultados e limitando a interpretação do efeito da suplementação dos meios de vitrificação.

Na era genômica, a lipidômica recebeu ainda pouca atenção e muito precisa ser compreendido a respeito da homeostase da membrana e do metabolismo lipídico em oócitos e embriões pré-implantação. Em laboratórios de fertilização *in vitro*, embriões e oócitos são criopreservados rotineiramente e o aprimoramento do conhecimento do papel dos lipídios pode ser útil no futuro para melhorar a eficiência dos protocolos *in vitro* atualmente disponíveis para os TRA. Portanto, estudos focados na análise do perfil lipídico por espectrometria de massa podem nos ajudar a entender em maior profundidade os efeitos de cada etapa da vitrificação nas respostas adaptativas e remodelação de membranas e, finalmente, seu impacto na função celular e no desenvolvimento.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, analisamos os efeitos da adição de ácidos graxos e um ativador antioxidante/metabólico a meios de vitrificação no desenvolvimento embrionário e no perfil lipídico de oócitos utilizando um ensaio de embrião de camundongo. Embora nenhum benefício da adição de ácidos oleico e linoléico aos meios de vitrificação de oócitos tenha sido detectado nas taxas de desenvolvimento embrionário, a investigação do impacto desses lipídios associados à L-carnitina adicionada aos meios de vitrificação na criopreservação de oócitos humanos é crucial para contornar as limitações potenciais deste estudo pré-clínico e para entender como as modificações do perfil lipídico da membrana vistas aqui podem estar relacionadas a uma fase de equilíbrio "menos estressante" e a futuras melhorias nos protocolos de vitrificação de oócitos e embriões. O perfil lipídico e os resultados de fertilização *in vitro* de oócitos equilibrados ou vitrificados-aquecidos em T4, formulado com aminoácidos específicos e trealose, evidenciaram a contribuição deste carboidrato como crioprotetor não-permeante e/ou aminoácidos na estabilização das membranas do oócito de forma mais eficiente em condições estressantes, como a longa exposição aos crioprotetores. Apesar do risco de variabilidade no desempenho da prototipagem do meio T4 devido à produção em escala de laboratório, resultados satisfatórios foram obtidos em relação ao perfil lipídico e resultados de FIV em comparação com um meio de vitrificação padrão comercial. Além disso, mesmo pequenas mudanças no protocolo de vitrificação, como a duração da fase de equilíbrio, alteraram o perfil lipídico do oócito, que puderam ser monitorados com sucesso pelo método MRM *profiling*. Demonstramos que o protocolo de equilíbrio longo foi mais propenso a induzir distúrbios da membrana dos oócitos expostos a uma solução de equilíbrio padrão, caracterizada por uma super-representação de ácidos graxos livres, fosfatidilserinas, fosfatidilinositóis e uma abundância relativa reduzida de lipídios estruturais, como fosfatidilcolinas e esfingolmielinas.

Além disso, nossos dados fornecem informações importantes sobre a associação de diferentes modos de concepção (espontânea e assistida) e etapas das TRA a alterações na abundância relativa de lipídios em blastocistos de camundongos. A superovulação por si só resultou na regulação positiva de alguns PL incluindo PC, PS e esfingolipídios, como esfingolmielinas e uma ligeira redução de alguns ácidos graxos livres. A FIV promoveu mudanças mais extensas no perfil lipídico dos blastocistos, relacionadas ao aumento geral da abundância de vários lipídios de membrana, incluindo PC, PS, PE, PI, SM e ácidos graxos

livres em comparação com blastocistos produzidos *in vivo* a partir de ciclos superovulados ou naturais. O processo de vitrificação alterou o perfil lipídico dos blastocistos, causando uma redução geral na abundância de lipídios da membrana incluindo PI, PC, PCo, PS, PEO; esfingomielinas além de ácidos graxos livres. Neste estudo, pela primeira vez, demonstramos que mesmo um curto tempo de exposição às soluções à base de lipídios durante a vitrificação de oócitos são suficientes para induzir alterações no perfil lipídico que foram sustentadas até a fase de blastocisto. A presença de ácidos graxos insaturados e L-carnitina nos meios de vitrificação parecem ter auxiliado na estabilização da membrana, mantendo o perfil lipídico dos embriões derivados de oócitos expostos a soluções a base de lipídios semelhante ao dos blastocistos de FIV utilizando oócitos frescos, aumentando a importância de estratégias para preservar a estabilidade do conteúdo lipídico em gametas e embriões frente às alterações induzidas pelo ambiente *in vitro*, principalmente durante a vitrificação.

Todas essas alterações no perfil lipídico induzidas pelo ambiente *in vitro* poderiam ter uma influência potencial na prole de TRA mais tarde, em doenças relacionadas à homeostase de lipídios, entre outras, sendo necessárias investigações em estudos clínicos para confirmar nossos achados.

REFERÊNCIAS

- AARDEMA, H. *et al.* Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biol Reprod**, v.85, n. 1, p. 62-69, Jul 2011. 10.1095/biolreprod.110.088815.
- ABD-EL-RAZEK, I. M. *et al.* Difference in lipid composition between in vivo-and in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.55, n. 1, 2000.
- ABE, H. *et al.* Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Mol Reprod Dev**, v.61, n. 1, p. 57-66, Jan 2002. 10.1002/mrd.1131.
- ADAMSON, G. D. *et al.* International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2011. **Fertil Steril**, v.110, n. 6, p. 1067-1080, Nov 2018. 10.1016/j.fertnstert.2018.06.039.
- AIZAWA, R. *et al.* Synthesis and maintenance of lipid droplets are essential for mouse preimplantation embryonic development. **Development**, v.146, n. 22, Nov 25 2019. 10.1242/dev.181925.
- ALBI, E. *et al.* The role of intranuclear lipids. **Biol Cell**, v.96, n. 8, p. 657-667, Oct 2004. 10.1016/j.biolcel.2004.05.004.
- ANNES, K. *et al.* Lipid characterization of in vitro-produced bovine embryos with distinct kinetics of development. **Zygote**, v.27, n. 6, p. 413-422, Dec 2019. 10.1017/s0967199419000534.
- ARCARONS, N. *et al.* Cholesterol added prior to vitrification on the cryotolerance of immature and in vitro matured bovine oocytes. **PLoS One**, v.12, n. 9, p. e0184714, 2017. 10.1371/journal.pone.0184714.
- ARGYLE, C. E. *et al.* Oocyte cryopreservation: where are we now? **Hum Reprod Update**, v.22, n. 4, p. 440-449, 06 2016. 10.1093/humupd/dmw007. <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27006004>
- ASRM. Ethics Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Planned oocyte cryopreservation for women seeking to preserve future reproductive potential: an Ethics Committee opinion. **Fertil Steril**, v.110, n. 6, p. 1022-1028, Nov 2018. 10.1016/j.fertnstert.2018.08.027.
- ASRM. More than 77 Thousand Babies Born from ART. Disponível em: <https://http://www.asrm.org/news-and-publications/news-and-research/press-releases-and-bulletins/more-than-77-thousand-babies-born-from-ART/>.
- ASRM *et al.* Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. **Fertil Steril**, v.99, n. 1, p. 37-43, Jan 2013. 10.1016/j.fertnstert.2012.09.028.
- BARCELÓ-FIMBRES, M. *et al.* Cross-validation of techniques for measuring lipid content

of bovine oocytes and blastocysts. **Theriogenology**, v.75, n. 3, p. 434-444, Feb 2011. 10.1016/j.theriogenology.2010.09.007.

BAUMANN, C. G. *et al.* The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. **Mol Reprod Dev**, v.74, n. 10, p. 1345-1353, Oct 2007. 10.1002/mrd.20604.

BAUST, J. M. *et al.* Cryopreservation: Evolution of Molecular Based Strategies. **Adv Exp Med Biol**, v.951, p. 13-29, 2016. 10.1007/978-3-319-45457-3_2.

BECKER, T. *et al.* Role of phosphatidylethanolamine in the biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. **J Biol Chem**, v.288, n. 23, p. 16451-16459, Jun 7 2013. 10.1074/jbc.M112.442392.

BERTELI, T. S. *et al.* Relationship between the duration of equilibration step of the vitrification and changes on abundance and composition of oocyte membrane lipids. *In: 76th American Society for Reproductive Medicine (ASRM), 2020, Scientific Congress.*

BOLAND, L. M. *et al.* Polyunsaturated fatty acid modulation of voltage-gated ion channels. **Cell Biochem Biophys**, v.52, n. 2, p. 59-84, 2008. 10.1007/s12013-008-9027-2.

BORGES, E. D. *et al.* Updating the Impact of Lipid Metabolism Modulation and Lipidomic Profiling on Oocyte Cryopreservation. **European Medical Journal**, v.4, n. 1, p. 79-87, 2019.

BURNUM, K. E. *et al.* Spatial and temporal alterations of phospholipids determined by mass spectrometry during mouse embryo implantation. **J Lipid Res**, v.50, n. 11, p. 2290-2298, Nov 2009. 10.1194/jlr.M900100-JLR200.

CARROLL, J. *et al.* Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. **J Reprod Fertil**, v.90, n. 2, p. 547-553, Nov 1990. 10.1530/jrf.0.0900547.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, C. **Assisted Reproductive Technology Fertility Clinic and National Summary Report**. Internet, 5 August 2021 2019. Disponível em: <https://http://www.cdc.gov/art/reports/2019/fertility-clinic.html>.

CHEN, C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. **Lancet**, v.1, n. 8486, p. 884-886, Apr 19 1986. 10.1016/s0140-6736(86)90989-x.

CHORILLI, M. *et al.* Animais de laboratório: o camundão. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.28, n. 1, p. 11-23, 2007.

CLARK, N. A. *et al.* Oocyte cryopreservation: searching for novel improvement strategies. **J Assist Reprod Genet**, v.30, n. 7, p. 865-875, Jul 2013. 10.1007/s10815-013-0028-8.

COBO, A. *et al.* Effect of oocyte vitrification on embryo quality: time-lapse analysis and morphokinetic evaluation. **Fertil Steril**, v.108, n. 3, p. 491-497 e493, Sep 2017. 10.1016/j.fertnstert.2017.06.024.

COBO, A. *et al.* Accumulation of oocytes: a new strategy for managing low-responder patients. **Reprod Biomed Online**, v.24, n. 4, p. 424-432, Apr 2012.

10.1016/j.rbmo.2011.12.012.

COBO, A. *et al.* Six years' experience in ovum donation using vitrified oocytes: report of cumulative outcomes, impact of storage time, and development of a predictive model for oocyte survival rate. **Fertil Steril**, v.104, n. 6, p. 1426-1434 e1421-1428, Dec 2015. 10.1016/j.fertnstert.2015.08.020.

COBO, A. *et al.* Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. **Fertil Steril**, v.89, n. 6, p. 1657-1664, Jun 2008. 10.1016/j.fertnstert.2007.05.050.

CORNET-BARTOLOMÉ, D. *et al.* Efficiency and efficacy of vitrification in 35 654 sibling oocytes from donation cycles. **Hum Reprod**, v.35, n. 10, p. 2262-2271, Oct 2020. 10.1093/humrep/deaa178. <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32856058>

COTICCHIO, G. *et al.* Truths and myths of oocyte sensitivity to controlled rate freezing. **Reprod Biomed Online**, v.15, n. 1, p. 24-30, Jul 2007. 10.1016/s1472-6483(10)60687-6.

COTICCHIO, G. *et al.* Qualitative and morphometric analysis of the ultrastructure of human oocytes cryopreserved by two alternative slow cooling protocols. **J Assist Reprod Genet**, v.27, n. 4, p. 131-140, Apr 2010. 10.1007/s10815-010-9394-7.

COTICCHIO, G. *et al.* Vitrification may increase the rate of chromosome misalignment in the metaphase II spindle of human mature oocytes. **Reprod Biomed Online**, v.19 Suppl 3, p. 29-34, 2009. 10.1016/s1472-6483(10)60281-7.

CROSIER, A. E. *et al.* Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. **Biol Reprod**, v.64, n. 5, p. 1375-1385, May 2001. 10.1095/biolreprod64.5.1375.

DE LIMA, C. B. *et al.* Comprehensive lipid profiling of early stage oocytes and embryos by MRM profiling. **J Mass Spectrom**, v.53, n. 12, p. 1247-1252, Dec 2018. 10.1002/jms.4301.

DE VOS, M. *et al.* Fertility preservation in women with cancer. **Lancet**, v.384, n. 9950, p. 1302-1310, Oct 4 2014. 10.1016/s0140-6736(14)60834-5.

DEL COLLADO, M. *et al.* Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. **Reprod Fertil Dev**, May 19 2015. 10.1071/rd15067.

DI PAOLO, G. *et al.* Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. **Nature**, v.443, n. 7112, p. 651-657, Oct 12 2006. 10.1038/nature05185.

DUNNING, K. R. *et al.* Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. **Biol Reprod**, v.83, n. 6, p. 909-918, Dec 2010. 10.1095/biolreprod.110.084145.

DUNNING, K. R. *et al.* Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. **Reproduction**, v.148, n. 1, p. R15-27, Jul 2014. 10.1530/rep-13-0251.

DUTTA, S. *et al.* Men and mice: Relating their ages. **Life Sci**, v.152, p. 244-248, May 1 2016. 10.1016/j.lfs.2015.10.025.

ENDO, K. *et al.* The developmental ability of vitrified oocytes from different mouse strains assessed by parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection. **J Reprod Dev**, v.53, n. 6, p. 1199-1206, Dec 2007. 10.1262/jrd.19058.

EYSTER, K. M. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. **Adv Physiol Educ**, v.31, n. 1, p. 5-16, Mar 2007. 10.1152/advan.00088.2006.

FAUSER, B. C. Towards the global coverage of a unified registry of IVF outcomes. **Reprod Biomed Online**, v.38, n. 2, p. 133-137, Feb 2019. 10.1016/j.rbmo.2018.12.001.

GALLARDO, M. *et al.* Human oocytes and zygotes are ready for ultra-fast vitrification after 2 minutes of exposure to standard CPA solutions. **Sci Rep**, v.9, n. 1, p. 15986, Nov 5 2019. 10.1038/s41598-019-52014-x.

GARDNER, D. K. *et al.* Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. **Theriogenology**, v.67, n. 1, p. 64-72, Jan 1 2007. 10.1016/j.theriogenology.2006.09.012.

GHANEM, N. *et al.* Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced in vitro and cultured with chemicals modulating lipid metabolism. **Theriogenology**, v.82, n. 2, p. 238-250, Jul 15 2014. 10.1016/j.theriogenology.2014.03.024.

GLUJOVSKY, D. *et al.* Vitrification versus slow freezing for women undergoing oocyte cryopreservation. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 9, p. CD010047, Sep 5 2014. 10.1002/14651858.CD010047.pub2.

GONZÁLEZ-SERRANO, A. F. *et al.* Desorption electrospray ionization mass spectrometry reveals lipid metabolism of individual oocytes and embryos. **PLoS One**, v.8, n. 9, p. e74981, 2013. 10.1371/journal.pone.0074981.

GOOK, D. A. *et al.* Human oocyte cryopreservation. **Hum Reprod Update**, v.13, n. 6, p. 591-605, Nov-Dec 2007. 10.1093/humupd/dmm028.

GUPTA, M. K. *et al.* Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v.93, n. 8, p. 2602-2607, May 15 2010. 10.1016/j.fertnstert.2010.01.043.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**, v.141, n. 2, p. 312-322, Jun 2006. 10.1104/pp.106.077073.

HANNUN, Y. A. *et al.* The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. **J Biol Chem**, v.277, n. 29, p. 25847-25850, Jul 19 2002. 10.1074/jbc.R200008200.

HERRERO, L. *et al.* Avoiding the use of human chorionic gonadotropin combined with

oocyte vitrification and GnRH agonist triggering versus coasting: a new strategy to avoid ovarian hyperstimulation syndrome. **Fertil Steril**, v.95, n. 3, p. 1137-1140, Mar 1 2011. 10.1016/j.fertnstert.2010.09.040.

HOCHI, S. *et al.* Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. **Theriogenology**, v.52, n. 3, p. 497-504, Aug 1999. 10.1016/s0093-691x(99)00146-6.

HOTAMISLIGIL, S. *et al.* Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. **Biol Reprod**, v.55, n. 1, p. 161-168, Jul 1996. 10.1095/biolreprod55.1.161.

HOU, T. Y. *et al.* Omega-3 fatty acids, lipid rafts, and T cell signaling. **Eur J Pharmacol**, v.785, p. 2-9, Aug 15 2016. 10.1016/j.ejphar.2015.03.091.

HSUEH, A. J. *et al.* Gonadotropins and their receptors: coevolution, genetic variants, receptor imaging, and functional antagonists. **Biol Reprod**, v.99, n. 1, p. 3-12, Jul 1 2018. 10.1093/biolre/iroy012.

ISHIDA, G. M. *et al.* The optimal equilibration time for mouse embryos frozen by vitrification with trehalose. **Hum Reprod**, v.12, n. 6, p. 1259-1262, Jun 1997. 10.1093/humrep/12.6.1259.

ISHIZUKA, Y. *et al.* Prolonged exposure to hyaluronidase decreases the fertilization and development rates of fresh and cryopreserved mouse oocytes. **J Reprod Dev**, v.60, n. 6, p. 454-459, 2014. 10.1262/jrd.2014-045.

JUNG, G. T. *et al.* Lipidomic changes in mouse oocytes vitrified in PEG 8000-supplemented vitrification solutions. **Cryobiology**, v.99, p. 140-148, Apr 2021. 10.1016/j.cryobiol.2020.11.004.

JUNG, J. *et al.* Analysis of the phospholipid profile of metaphase II mouse oocytes undergoing vitrification. **PLoS One**, v.9, n. 7, p. e102620, 2014. 10.1371/journal.pone.0102620.

KULESHOVA, L. *et al.* Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. **Hum Reprod**, v.14, n. 12, p. 3077-3079, Dec 1999. 10.1093/humrep/14.12.3077.

KUWAYAMA, M. *et al.* Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reprod Biomed Online**, v.11, n. 3, p. 300-308, Sep 2005. 10.1016/s1472-6483(10)60837-1.

LANE, M. *et al.* Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. **Hum Reprod**, v.17, n. 10, p. 2686-2693, Oct 2002. 10.1093/humrep/17.10.2686.

LEÃO, B. C. *et al.* Improved embryonic cryosurvival observed after in vitro supplementation with conjugated linoleic acid is related to changes in the membrane lipid profile. **Theriogenology**, v.84, n. 1, p. 127-136, Jul 1 2015. 10.1016/j.theriogenology.2015.02.023.

LEÃO, B. C. S. *et al.* Membrane lipid profile of in vitro-produced embryos is affected by vitrification but not by long-term dietary supplementation of polyunsaturated fatty acids for oocyte donor beef heifers. **Reprod Fertil Dev**, v.29, n. 6, p. 1217-1230, Jun 2017. 10.1071/rd15414.

LEN, J. S. *et al.* The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. **Biosci Rep**, v.39, n. 8, Aug 30 2019. 10.1042/bsr20191601.

LEVENTAL, K. R. *et al.* Lipidomic and biophysical homeostasis of mammalian membranes counteracts dietary lipid perturbations to maintain cellular fitness. **Nat Commun**, v.11, n. 1, p. 1339, Mar 12 2020. 10.1038/s41467-020-15203-1.

LIU, Z. *et al.* FSH and FOXO1 regulate genes in the sterol/steroid and lipid biosynthetic pathways in granulosa cells. **Mol Endocrinol**, v.23, n. 5, p. 649-661, May 2009. 10.1210/me.2008-0412.

LOEWENSTEIN, J. E. *et al.* DRY MASS, LIPID CONTENT AND PROTEIN CONTENT OF THE INTACT AND ZONA-FREE MOUSE OVUM. **J Embryol Exp Morphol**, v.12, p. 113-121, Mar 1964.

LOGSDON, D. M. *et al.* Fatty acids present in commercial albumin preparations differentially affect development of murine embryos before and during implantation. **Fert Stert Science** v.2, n. 1, p. 50-58, 2021.

LOLICATO, F. *et al.* The cumulus cell layer protects the bovine maturing oocyte against fatty acid-induced lipotoxicity. **Biol Reprod**, v.92, n. 1, p. 16, Jan 2015. 10.1095/biolreprod.114.120634.

MAGNUSSON, V. *et al.* Bovine oocyte vitrification: effect of ethylene glycol concentrations and meiotic stages. **Anim Reprod Sci**, v.106, n. 3-4, p. 265-273, Jul 2008. 10.1016/j.anireprosci.2007.05.001.

MANDAWALA, A. A. *et al.* Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. **Theriogenology**, v.86, n. 7, p. 1637-1644, Oct 2016. 10.1016/j.theriogenology.2016.07.018.

<https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27555525>

MANJUNATHA, B. M. *et al.* Effect of vitrification medium composition and exposure time on post-thaw development of buffalo embryos produced in vitro. **Vet J**, v.179, n. 2, p. 287-291, Feb 2009. 10.1016/j.tvjl.2007.08.031.

MANSOUR, G. *et al.* L-carnitine supplementation reduces oocyte cytoskeleton damage and embryo apoptosis induced by incubation in peritoneal fluid from patients with endometriosis. **Fertil Steril**, v.91, n. 5 Suppl, p. 2079-2086, May 2009. 10.1016/j.fertnstert.2008.02.097.

MAREI, W. F. *et al.* Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. **Reproduction**, v.139, n. 6, p. 979-988, Jun 2010. 10.1530/rep-09-0503.

MATSON, P. L. *et al.* Cryopreservation of oocytes and embryos: use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an in-vitro

fertilization programme. **Hum Reprod**, v.12, n. 7, p. 1550-1553, Jul 1997. 10.1093/humrep/12.7.1550.

MITSUHATA, S. *et al.* Effect of equilibration time on clinical and neonatal outcomes in human blastocysts vitrification. **Reprod Med Biol**, v.19, n. 3, p. 270-276, Jul 2020. 10.1002/rmb2.12328.

MOAWAD, A. R. *et al.* L-carnitine supplementation during vitrification of mouse oocytes at the germinal vesicle stage improves preimplantation development following maturation and fertilization in vitro. **Biol Reprod**, v.88, n. 4, p. 104, Apr 2013. 10.1095/biolreprod.112.107433.

MOAWAD, A. R. *et al.* l-carnitine supplementation during vitrification of mouse germinal vesicle stage-oocytes and their subsequent in vitro maturation improves meiotic spindle configuration and mitochondrial distribution in metaphase II oocytes. **Hum Reprod**, v.29, n. 10, p. 2256-2268, Oct 10 2014. 10.1093/humrep/deu201.

NAKAGATA, N. *et al.* Positive effect of partial zona-pellucida dissection on the in vitro fertilizing capacity of cryopreserved C57BL/6J transgenic mouse spermatozoa of low motility. **Biol Reprod**, v.57, n. 5, p. 1050-1055, Nov 1997. 10.1095/biolreprod57.5.1050.

NOTTOLA, S. A. *et al.* Freeze/thaw stress induces organelle remodeling and membrane recycling in cryopreserved human mature oocytes. **J Assist Reprod Genet**, v.33, n. 12, p. 1559-1570, Dec 2016. 10.1007/s10815-016-0798-x.

NOTTOLA, S. A. *et al.* Ultrastructure of human mature oocytes after slow cooling cryopreservation with ethylene glycol. **Reprod Biomed Online**, v.17, n. 3, p. 368-377, Sep 2008. 10.1016/s1472-6483(10)60220-9.

NOTTOLA, S. A. *et al.* Ultrastructural markers of quality in human mature oocytes vitrified using cryoleaf and cryoloop. **Reprod Biomed Online**, v.19 Suppl 3, p. 17-27, 2009. 10.1016/s1472-6483(10)60280-5.

NOTTOLA, S. A. *et al.* Ultrastructure of human mature oocytes after slow cooling cryopreservation using different sucrose concentrations. **Hum Reprod**, v.22, n. 4, p. 1123-1133, Apr 2007. 10.1093/humrep/del463.

OHATA, K. *et al.* Effects of fatty acid supplementation during vitrification and warming on the developmental competence of mouse, bovine and human oocytes and embryos. **Reprod Biomed Online**, v.43, n. 1, p. 14-25, Jul 2021. 10.1016/j.rbmo.2021.03.022.

OUDE WEERNINK, P. A. *et al.* Dynamic phospholipid signaling by G protein-coupled receptors. **Biochim Biophys Acta**, v.1768, n. 4, p. 888-900, Apr 2007. 10.1016/j.bbamem.2006.09.012.

OUELLETTE, M. *et al.* Linoleic acid supplementation of cell culture media influences the phospholipid and lipid profiles of human reconstructed adipose tissue. **PLoS One**, v.14, n. 10, p. e0224228, 2019. 10.1371/journal.pone.0224228.

PACZKOWSKI, M. *et al.* Fatty acid metabolism during maturation affects glucose uptake

and is essential to oocyte competence. **Reproduction**, v.148, n. 4, p. 429-439, Oct 2014. 10.1530/rep-14-0015.

PELECH, S. L. *et al.* Membrane-bound CTP:phosphocholine cytidyltransferase regulates the rate of phosphatidylcholine synthesis in HeLa cells treated with unsaturated fatty acids. **Biochim Biophys Acta**, v.795, n. 3, p. 433-440, Oct 4 1984. 10.1016/0005-2760(84)90169-3.

PELECH, S. L. *et al.* Fatty acids promote translocation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase to the endoplasmic reticulum and stimulate rat hepatic phosphatidylcholine synthesis. **J Biol Chem**, v.258, n. 11, p. 6782-6788, Jun 10 1983.

RIENZI, L. *et al.* Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. **Hum Reprod Update**, v.23, n. 2, p. 139-155, Mar 1 2017. 10.1093/humupd/dmw038.

ROHRBACH, S. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on mitochondria. **Curr Pharm Des**, v.15, n. 36, p. 4103-4116, 2009. 10.2174/138161209789909692.

RUDOLPH, A. S. *et al.* Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. **Cryobiology**, v.22, n. 4, p. 367-377, Aug 1985. 10.1016/0011-2240(85)90184-1.

SANCHES, B. V. *et al.* 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 1 2013. 10.1016/j.theriogenology.2013.04.026.

SANCHEZ-PARTIDA, L. G. *et al.* The generation of live offspring from vitrified oocytes. **PLoS One**, v.6, n. 6, p. e21597, 2011. 10.1371/journal.pone.0021597.

SCHUMANN, J. It is all about fluidity: Fatty acids and macrophage phagocytosis. **Eur J Pharmacol**, v.785, p. 18-23, Aug 15 2016. 10.1016/j.ejphar.2015.04.057.

SEKI, S. *et al.* Ultra-rapid warming yields high survival of mouse oocytes cooled to -196°C in dilutions of a standard vitrification solution. **PLoS One**, v.7, n. 4, p. e36058, 2012. 10.1371/journal.pone.0036058.

SHAIKH, S. R. *et al.* How polyunsaturated fatty acids modify molecular organization in membranes: insight from NMR studies of model systems. **Biochim Biophys Acta**, v.1848, n. 1 Pt B, p. 211-219, Jan 2015. 10.1016/j.bbamem.2014.04.020.

SHEHAB-EL-DEEN, M. A. *et al.* Cryotolerance of bovine blastocysts is affected by oocyte maturation in media containing palmitic or stearic acid. **Reprod Domest Anim**, v.44, n. 1, p. 140-142, Feb 2009. 10.1111/j.1439-0531.2008.01084.x.

SOMFAI, T. *et al.* Enhancement of lipid metabolism with L-carnitine during in vitro maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes. **Reprod Fertil Dev**, v.23, n. 7, p. 912-920, 2011. 10.1071/rd10339.

SOMFAI, T. *et al.* Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in

vitro maturation and solid surface vitrification: effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. **Cryobiology**, v.55, n. 2, p. 115-126, Oct 2007. 10.1016/j.cryobiol.2007.06.008.

SOMOSKOI, B. *et al.* Different chromatin and energy/redox responses of mouse morulae and blastocysts to slow freezing and vitrification. **Reprod Biol Endocrinol**, v.13, p. 22, Mar 24 2015. 10.1186/s12958-015-0018-z.

STANLEY, W. C. *et al.* Update on lipids and mitochondrial function: impact of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.15, n. 2, p. 122-126, Mar 2012. 10.1097/MCO.0b013e32834fdaf7.

STURMEY, R. G. *et al.* Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reprod Domest Anim**, v.44 Suppl 3, p. 50-58, Sep 2009. 10.1111/j.1439-0531.2009.01402.x.

SUDANO, M. J. *et al.* Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. **Biol Reprod**, v.87, n. 6, p. 130, Jun 2012. 10.1095/biolreprod.112.102897.

TEMPLE, M. D. *et al.* Complex cellular responses to reactive oxygen species. **Trends Cell Biol**, v.15, n. 6, p. 319-326, Jun 2005. 10.1016/j.tcb.2005.04.003.

TRUONG, T. T. *et al.* Antioxidants increase blastocyst cryosurvival and viability post-vitrification. **Hum Reprod**, v.35, n. 1, p. 12-23, Jan 1 2020. 10.1093/humrep/dez243.

VAN BLERKOM, J. *et al.* Cytogenetic, cellular, and developmental consequences of cryopreservation of immature and mature mouse and human oocytes. **Microsc Res Tech**, v.27, n. 2, p. 165-193, Feb 1 1994. 10.1002/jemt.1070270209.

VAN MEER, G. *et al.* Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.9, n. 2, p. 112-124, Feb 2008. 10.1038/nrm2330.

VANCE, J. E. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. **J Lipid Res**, v.49, n. 7, p. 1377-1387, Jul 2008. 10.1194/jlr.R700020-JLR200.

VANCE, J. E. *et al.* Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. **Biochim Biophys Acta**, v.1831, n. 3, p. 543-554, Mar 2013. 10.1016/j.bbalip.2012.08.016.

VERRUMA, C. G. *et al.* Substituição parcial do soro fetal bovino durante cultivo in vitro reduz a concentração de fosfolípidios em embriões bovinos produzidos in vitro. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.44, n. 3, p. 108-115, 2020. 10.21451/1809-3000.RBRA2020.005.

VIANA, I. R. *et al.*, 2018, Barcelona, Spain. **Lipid and antioxidant supplements improve cryptolerance and embryonic quality of metaphase II mouse oocytes undergoing vitrification.**

VIANA, I. R. G. *et al.* Composição de vitrificação e/ou aquecimento, processo para melhorar

a criopreservação de células, e uso da composição de vitrificação e/ou aquecimento. PAULO, I. U. d. S. Brasil. BR102019013697-9 2019.

VINCENT, C. *et al.* The hardening effect of dimethylsulphoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. **J Reprod Fertil**, v.89, n. 1, p. 253-259, May 1990. 10.1530/jrf.0.0890253.

VIREQUE, A. A. *et al.* Dataset on lipid profile of bovine oocytes exposed to α -phosphatidylcholine during in vitro maturation investigated by MALDI mass spectrometry and gas chromatography-flame ionization detection. **Data Brief**, v.13, p. 480-486, Aug 2017. 10.1016/j.dib.2017.06.026.

WANG, C. T. *et al.* Optimized protocol for cryopreservation of human eggs improves developmental competence and implantation of resulting embryos. **J Ovarian Res**, v.6, n. 1, p. 15, Feb 13 2013. 10.1186/1757-2215-6-15.

WANG, L. *et al.* Quantitative investigations on the effects of exposure durations to the combined cryoprotective agents on mouse oocyte vitrification procedures. **Biol Reprod**, v.85, n. 5, p. 884-894, Nov 2011. 10.1095/biolreprod.110.090118.

WANG, L. Y. *et al.* Superovulation Induced Changes of Lipid Metabolism in Ovaries and Embryos and Its Probable Mechanism. **PLoS One**, v.10, n. 7, p. e0132638, 2015. 10.1371/journal.pone.0132638.

XIA, J. *et al.* MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. **Nucleic Acids Res**, v.43, n. W1, p. W251-257, Jul 1 2015. 10.1093/nar/gkv380.

ZHANG, W. *et al.* Advances on in vitro production and cryopreservation of porcine embryos. **Anim Reprod Sci**, v.132, n. 3-4, p. 115-122, Jun 2012. 10.1016/j.anireprosci.2012.05.008.

ZÜLLIG, T. *et al.* Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer. **Anal Bioanal Chem**, v.412, n. 10, p. 2191-2209, Apr 2020. 10.1007/s00216-019-02241-y.

ANEXO A



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*O impacto da vitrificação de oócitos murinos na prole: epigenética, fertilidade e comorbidades*”, registrado com o número **107/2017**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata*, *subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 25 de setembro de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 77 camundongos C57Bl 6 fêmeas, pesando 23g, 18 camundongos C57Bl 6 machos pesando 23g; 30 camundongos C57Bl 6 machos pesando 2g e 30 camundongos C57Bl 6 fêmeas, pesando 2g, oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 25/09/2017 a 23/07/2021.

We certify that the Protocol n° 107/2017, entitled “*Vitrification's impact of the murine oocytes in the offspring: epigenetics, fertility and comorbidities*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 09/25/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata*, *subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 77 female C57Bl 6 mice weighing 23g; 18 male C57Bl 6 mice weighing 23g; 30 male C57Bl/6 mice weighing 2g and 30 female C57Bl/6 mice weighing 2g from Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 07/23/2021.

Ribeirão Preto, 25 de setembro de 2017


Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA-FMRP – USP

ANEXO B

(1/ 2) Produção relacionada a tese - Publicada

1 RBMO VOLUME 00 ISSUE 0 2022

RBMO



ARTICLE

Equilibration solution composition and extended exposure to equilibration phase affect embryo development and lipid profile of mouse oocytes

**BIOGRAPHY**

Thalita Berteli is a PhD student in reproductive biology at the University of São Paulo (USP). She previously obtained her Master's degree from the Department of Gynecology and Obstetrics (USP). Her research interests are oocyte vitrification and the effect of IVF technologies on oocyte and embryo lipid profile.

Thalita S. Berteli^{1,2,*,#}, Alessandra A. Vireque^{4,#}, Caroline M. Da Luz^{1,2},
Eduardo D. Borges^{1,2}, Christina R. Ferreira³, Paula A. Navarro^{1,2}
