

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CULTIVO *IN VITRO* DE FRAGMENTO OVARIANO BOVINO
SUPLEMENTADO COM NANOCOMPÓSITOS DE ÓXIDO DE ZINCO
DOPADOS COM ÓXIDO DE CÁLCIO OU ÓXIDO DE MAGNÉSIO**

Mayara Mafra Soares
Médica veterinária

Uberlândia – MG

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CULTIVO *IN VITRO* DE FRAGMENTO OVARIANO BOVINO
SUPLEMENTADO COM NANOCOMPÓSITOS DE ÓXIDO DE ZINCO
DOPADOS COM ÓXIDO DE CÁLCIO OU ÓXIDO DE MAGNÉSIO**

Mayara Mafra Soares

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia - UFU, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias (Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva).

Orientadora: Profa. Dra. Ricarda Maria dos Santos

Uberlândia – MG

2023



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	TESE DE DOUTORADO PPGCVET Nº 08/2023				
Data:	26 DE SETEMBRO DE 2023	Hora de início:	8:00	Hora de encerramento:	12:15
Matrícula do Discente:	11813VET004				
Nome do Discente:	MAYARA MAFRA SOARES				
Título do Trabalho:	CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE FRAGMENTO OVARIANO BOVINO SUPLEMENTADO COM NANOCOMPÓSITOS DE ÓXIDO DE ZINCO DOPADOS COM ÓXIDO DE CÁLCIO OU ÓXIDO DE MAGNÉSIO				
Área de concentração:	PRODUÇÃO ANIMAL				
Linha de pesquisa:	BIOTÉCNICAS E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DOS REBANHOS BOVINOS				

Reuniu-se por videoconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Marcelo Emílio Beletti (FAMEV/UFU); Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva (FAMEV/UFU); Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva (FMRP/USP); José Felipe Warmling Sprícigo (EVZ/UFG); Ricarda Maria dos Santos (FAMEV/UFU), orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Ricarda Maria dos Santos, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Ricarda Maria dos Santos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/09/2023, às 15:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Emilio Beletti, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/09/2023, às 15:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elisa Sant'anna Monteiro da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/09/2023, às 17:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **José Felipe Warmling Sprícigo, Usuário Externo**, em 28/09/2023, às 09:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva, Usuário Externo**, em 05/10/2023, às 17:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4819321** e o código CRC **E8C27C59**.

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S876 2023	<p>Soares, Mayara Mafra, 1990- CULTIVO IN VITRO DE FRAGMENTO OVARIANO BOVINO SUPLEMENTADO COM NANOCOMPÓSITOS DE ÓXIDO DE ZINCO DOPADOS COM ÓXIDO DE CÁLCIO OU ÓXIDO DE MAGNÉSIO [recurso eletrônico] / Mayara Mafra Soares. - 2023.</p> <p>Orientadora: Ricarda Maria dos Santos. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2024.717 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Veterinária. I. Santos, Ricarda Maria dos, 1972-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós- graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 619</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

Aos meus pais e irmãos, por todo apoio e amor incondicional, sempre ao meu lado em todos os momentos da vida, comemorando nas vitórias e me dando suporte nas derrotas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre ser meu refúgio, a quem eu recorro diversas vezes, mais ainda no último ano, em busca de luzes no fim do túnel, que pudessem me acalmar e fortalecer nos dias difíceis.

Aos meus pais, Mafra e Joaquim, que sempre estiveram ao meu lado, me carregando no colo quando eu já estava sem forças para enfrentar os diversos obstáculos que encontrei neste caminho, me ensinando a sempre buscar a melhor forma de finalizar tudo que me propusesse a fazer, com título de responsáveis direto por este doutorado (principalmente minha mãe), pois me aconselharam a seguir caminhos jamais sonhados por mim, visando mais alternativas para meu futuro.

Meus irmãos Pollyanna e Robson, por todo apoio, mesmo que de forma duvidosa algumas vezes, com frases do tipo “acaba logo com isso”, “vou no dia da sua defesa só pra te fazer um monte de pergunta”, mas que apesar das brincadeiras, são minhas fontes de inspiração por serem excelentes profissionais.

Meus cunhados Natássia e Fernando e minhas sobrinhas Pietra, Anne e Ayla, pelo amor e felicidade que trazem para a minha vida, tornando meus dias mais leves.

Minha segunda família Rosuíta, Betão, Luiz e Luanne, que acompanharam de perto toda essa trajetória, comemorando comigo cada conquista e incentivando a ir sempre em busca do meu sucesso. Meu namorado Pio por todo amor, amizade, apoio e companheirismo, que aos trancos e barrancos aguentou meus surtos e ausências por diversas vezes.

Enfim família, se hoje cheguei aonde estou foi por enorme influência de todos. Amo de mais vocês!

A todos os meus amigos que apesar de ficarem bravos com a minha ausência, me incentivaram e deram forças para que eu conseguisse chegar até o final, minhas válvulas de escape tornando os meus dias mais descontraídos e felizes. Estou voltando!

Aos graduandos, técnicos, mestrandos, doutorandos e pós doutorandos do Laboratório de Reprodução Animal da UFU, Laboratório de Reprodução Humana da USP de Ribeirão Preto e laboratórios parceiros, por toda ajuda e ensinamentos indispensáveis para que pudesse realizar minha pesquisa. Em especial a Paula “Maria”, Ana Cláudia e Graci, que me socorreram com as análises e incentivaram quando algo dava errado. E a “Tia” Deize, minha grande amiga, a qual nem tenho palavras para agradecer tudo que sempre fez por

mim, mesmo quando não podia, ela dava seu jeitinho e me ajudava, mesmo que um tempinho depois, ela nunca falhava!

Aos laboratórios de Histologia da UFU, Rede de Laboratórios Multiusuário (RELAM/PROPP) da UFU e Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP e seus técnicos por fornecerem os equipamentos e suporte técnico para a realização dos experimentos. Em especial a Mariane (Mari) e Elizabete (Bete), técnicas do confocal da UFU e USP, que apareceram no meu caminho como anjos, sempre tentando me ajudar de tudo que é forma, estudando artigos, passando do horário, fazendo encaixes, escutando minhas lamentações e sofrendo comigo a cada análise que não dava certo e me incentivando a tentar de novo, vocês são pessoas muito especiais!!!

A minha orientadora, Dra. Ricarda, pela confiança, ensinamentos, paciência e exigências, me fazendo perceber que sou capaz de realizar atividades, as quais achava não ser capaz e além de tudo por toda a compreensão da morosidade desse processo.

A professora Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP - Reprodução Humana, pela disponibilidade e parceria de toda estrutura laboratorial, para que eu pudesse realizar todo meu experimento.

Ao professor Dr. Marcelo Emílio Beletti pela disponibilidade e auxílio com as análises de Histologia.

Ao professor Dr. Luiz Ricardo Goulart (in memorian) e seu Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU pela parceria de pesquisa e auxílio na montagem do desenho experimental e desenvolvimento do trabalho, em especial ao pós-graduando Lucas.

Aos professores da Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia, pelos conhecimentos, carinho e atenção.

A Vale do Embrião e sua equipe. Empresa que trabalho e que sempre me incentivaram e auxiliaram, para que eu conseguisse finalizar a tese.

Aos Médicos Veterinários e funcionários do Frigorífico de Morro Agudo pela disponibilidade e auxílio nas coletas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro para custear a execução do projeto.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Esquema experimental de cultivo *in vitro* de fragmento do córtex ovariano bovino em meio suplementado com diferentes concentrações teste de cloreto de cálcio e nanopartículas de óxido de zinco dopadas com óxido de cálcio.....26
- Figura 2:** Esquema experimental de cultivo *in vitro* de fragmento do córtex ovariano bovino em meio suplementado com diferentes concentrações teste de cloreto de magnésio e nanopartículas de óxido de zinco dopadas com óxido de magnésio.....27
- Figura 3:** Ilustração histológica da viabilidade de folículos ovarianos no córtex de ovário bovino. Folículo de transição viável (A), folículo de transição degenerado (B).
.....30
- Figura 4:** Intensidade de fluorescência emitida após o cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano bovino corados por IP em relação aos diferentes tratamentos (A) CF; (B) CONT; (C) CA10; (D) CA20; (E) CA30; (F) NPCA10; (G) NPCA20; (H) NPCA30.....32
- Figura 5:** Intensidade de fluorescência emitida após o cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano bovino corados por DCF em relação aos diferentes tratamentos (A) CF; (B) CONT; (C) CA10; (D) CA20; (E) CA30; (F) NPCA10; (G) NPCA20; (H) NPCA30.....33
- Figura 6:** Intensidade de autofluorescência NAD emitida após o cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano bovino em relação aos diferentes tratamentos (A) CF; (B) CONT; (C) CA10; (D) CA20; (E) CA30; (F) NPCA10; (G) NPCA20; (H) NPCA30.....35
- Figura 7:** Intensidade de autofluorescência FAD emitida após o cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano bovino em relação aos diferentes tratamentos (A) CF; (B) CONT; (C) CA10; (D) CA20; (E) CA30; (F) NPCA10; (G) NPCA20; (H) NPCA30.....36
- Figura 8:** Intensidade de fluorescência emitida após o cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano bovino corados por IP em relação aos diferentes tratamentos

(A) CF; (B) CONT; (C) MG10; (D) MG20; (E) MG30; (F) NPMG10; (G) NPMG20; (H) NPMG30.....39

Figura 9: Intensidade de fluorescência emitida após o cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano bovino corados por DCF em relação aos diferentes tratamentos (A) CF; (B) CONT; (C) MG10; (D) MG20; (E) MG30; (F) NPMG10; (G) NPMG20; (H) NPMG30.....40

Figura 10: Intensidade de autofluorescência NAD emitida após o cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano bovino em relação aos diferentes tratamentos (A) CF; (B) CONT; (C) MG10; (D) MG20; (E) MG30; (F) NPMG10; (G) NPMG20; (H) NPMG30.....42

Figura 11: Intensidade de autofluorescência FAD emitida após o cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano bovino em relação aos diferentes tratamentos (A) CF; (B) CONT; (C) MG10; (D) MG20; (E) MG30; (F) NPMG10; (G) NPMG20; (H) NPMG30.....43

LISTA DE TABELA

Tabela 1:	Degeneração celular medida pela intensidade de fluorescência (pixels) emitida pelo iodeto de propídeo (I.P.) nos fragmentos de cortex ovariano bovino nos diferentes tratamentos de CA e NPCA, em D0 e D7.....	32
Tabela 2:	Emissão de EROs medida medida pela intensidade de fluorescência (pixels) emitida pelo DCF nos fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de CA e NPCA, em D0 e D7.....	33
Tabela 3:	Níveis de emissão de NAD(P)H medida pela autofluorescência (pixels) nos fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de CA e NPCA, em D0 e D7.....	34
Tabela 4:	Níveis de emissão de FAD medida pela autofluorescência (pixels) nos fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de CA e NPCA, em D0 e D7.....	35
Tabela 5:	Comparação entre os níveis de emissão do potencial redox logFAD: NAD(P)H medida pela autofluorescência (pixels) nos fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de CA e NPCA, em D0 e D7.....	36
Tabela 6:	Proporção (Média ± EPM) de folículos viáveis em fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de CA e NPCA, em D0 e D7.	37
Tabela 7:	Proporção (Média ± EPM) de folículos ativados em fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de CA e NPCA, em D0 e D7.....	38
Tabela 8:	Degeneração celular medida pela intensidade de fluorescência (pixels) emitida pelo iodeto de propídeo (I.P.) nos fragmentos de cortex ovariano bovino nos diferentes tratamentos de MG e NPMG, em D0 e D7.....	39
Tabela 9:	Emissão de EROs medida pela intensidade de fluorescência (pixels) emitida pelo pelo DCF nos fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de MG e NPMG, em D0 e D7.....	40
Tabela 10:	Níveis de emissão de NADP(H) medida pela autofluorescência (pixels) nos fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de MG e NPMG, em D0 e D7.....	41

Tabela 11:	Níveis de emissão de FAD medida pela autofluorescência (pixels) nos fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de MG e NPMG, em D0 e D7.....	42
Tabela 12:	Comparação entre os níveis de emissão do potencial redox logFAD: NAD(P)H medida pela autofluorescência (pixels) nos fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de MG e NPMG, em D0 e D7.....	43
Tabela 13:	Proporção (Média ± EPM) de folículos viáveis em fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de MG e NPMG, em D0 e D7.....	44
Tabela 14:	Proporção (Média ± EPM) de folículos ativados em fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de MG e NPMG, em D0 e D7.....	45

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1. REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1. OVOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE.....	17
1.2. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS	20
1.3. INFLUÊNCIA DOS ÍONS ZINCO, CÁLCIO E MAGNÉSIO NO CULTIVO CELULAR OVARIANO	21
1.4. NANOTECNOLOGIA	24
2. OBJETIVO GERAL	26
3. HIPÓTESE.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1. REAGENTES	26
4.2. COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS.....	26
4.3. AQUISIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	27
4.4. COLHEITA DO MATERIAL.....	27
4.5. DESENHO EXPERIMENTAL 1.....	28
4.6. DESENHO EXPERIMENTAL 2.....	29
4.7. OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS OVARIANOS - EXPERIMENTOS 1 E 2.....	29
4.8. CULTIVO <i>IN VITRO</i> - EXPERIMENTOS 1 E 2	30
4.9. AVALIAÇÕES DOS FRAGMENTOS OVARIANOS – EXPERIMENTOS 1 E 2.....	30
4.9.1. MICROSCOPIA CONFOCAL	30
4.9.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA	31
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5. RESULTADOS.....	33
5.1. EXPERIMENTO 1	33
5.1.1. MICROSCOPIA CONFOCAL	33
5.1.2. HISTOLOGIA.....	39
5.2. EXPERIMENTO 2	40
5.2.1. MICROSCOPIA CONFOCAL	40
5.2.2. HISTOLOGIA.....	46
6. DISCUSSÃO	47
6.1. EXPERIMENTO 1	47
6.2. EXPERIMENTO 2	50
CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS.....	52

CULTIVO *IN VITRO* DE FRAGMENTO OVARIANO BOVINO SUPLEMENTADO COM NANOCOMPÓSITOS DE ÓXIDO DE ZINCO DOPADOS COM ÓXIDO DE CÁLCIO OU ÓXIDO DE MAGNÉSIO

RESUMO

Objetivou-se testar a influência da suplementação do meio de cultivo *in vitro* com Nanocompósitos (NCs) de óxido de zinco dopado com cloreto de magnésio (ZnO:0,5 Mg-MgO) e NCs de óxido de zinco dopado com cloreto de cálcio (ZnO:0,5 Ca-CaO), comparados a suplementação pura desses minerais MgCl₂ e CaCl₂, em três concentrações 10, 20 e 30 µg/ml na viabilidade de fragmentos de tecido ovariano bovino cultivados *in vitro*. Para isso foram realizados 2 experimentos com os seguintes tratamentos: 1) Controle Fresco (CF), Controle (CONT), 10 µg/mL de cloreto de cálcio (CaCl₂) (CA10), 20 µg/mL de CaCl₂ (CA20), 30 µg/mL de CaCl₂ (CA30), 10 µg/mL de NP de ZnO:0,5Ca (NPCA10), 20 µg/mL de NP de ZnO:0,5Ca (NPCA20), 30 µg/mL de NP de ZnO:0,5Ca (NPCA30); 2) CF, CONT, 10 µg/mL de cloreto de magnésio (MgCl₂) (MG10), 20 µg/mL de MgCl₂ (MG20), 30 µg/mL de MgCl₂ (MG30), 10 µg/mL de NP de ZnO:0,5Mg (NPMG10), 20 µg/mL de NP de ZnO:0,5Mg (NPMG20), 30 µg/mL de NP de ZnO:0,5Mg (NPMG30). Foi analisada a degeneração celular, metabolismo respiratório das células pela emissão de NAD, FAD, estado redox, produção de EROs e por fim ativação e viabilidade folicular. Para a análise estatística foi utilizado o software SigmaPlot versão 11.0 (Systat Software, Inc., EUA), aplicando-se análise de variância e teste post hoc de Fisher LSD para comparação de médias, com significância $P < 0,05$. O tratamento NPCA20 apresentou maiores níveis de degeneração celular, maior produção de EROs e menor emissão de NAD(P)H e FAD, comparado ao CF e seu respectivo tratamento de CA20. O tratamento NPMG20 apresentou menor taxa de degeneração celular, maior produção de NAD e FAD, menor produção de EROs e boa viabilidade folicular quando comparado com os controles e MG20. Com isso conclui-se que a NP de ZnO:0,5Ca na concentração de 20 µg/mL prejudicou o desenvolvimento celular e folicular propondo efeitos citotóxicos no cultivo de fragmentos do córtex ovariano bovino. Já no segundo experimento, o processo de dopagem foi eficiente na NP ZnO:0,5Mg, proporcionando um ambiente favorável ao desenvolvimento celular e folicular, pois o processo de dopagem e a combinação correta dos íons revertem um possível quadro de toxicidade.

Palavras-chave: nanopartículas, nanocristais, desenvolvimento folicular, íons metálicos, MOIFOPA.

***IN VITRO* CULTURE OF BOVINE OVARIAN FRAGMENT SUPPLEMENTED WITH ZINC OXIDE NANOCOMPOSITES DOPED WITH CALCIUM OXIDE OR MAGNESIUM OXIDE**

ABSTRACT

The aim of this study was to test the influence of supplementing the *in vitro* culture medium with Nanocomposites (NCs) of zinc oxide doped with magnesium chloride (ZnO: 0.5 Mg-MgO) and NCs of zinc oxide doped with calcium chloride (ZnO: 0.5 Ca-CaO), compared to the pure supplementation of these minerals MgCl₂ and CaCl₂, in three concentrations 10, 20 and 30 µg/ml on the viability of bovine ovarian tissue fragments cultured *in vitro*. For this purpose, 2 experiments were carried out with the following treatments: 1) Fresh Control (CF), Control (CONT), 10 µg/mL of calcium chloride (CaCl₂) (CA10), 20 µg/mL of CaCl₂ (CA20), 30 µg/mL of CaCl₂ (CA30), 10 µg/mL of ZnO NP:0.5Ca (NPCA10), 20 µg/mL of ZnO NP:0.5Ca (NPCA20), 30 µg/mL of ZnO NP:0.5Ca (NPCA30); 2) CF, CONT, 10 µg/mL magnesium chloride (MgCl₂) (MG10), 20 µg/mL MgCl₂ (MG20), 30 µg/mL MgCl₂ (MG30), 10 µg/mL ZnO NP:0.5Mg (NPMG10), 20 µg/mL ZnO NP:0.5Mg (NPMG20), 30 µg/mL ZnO NP:0.5Mg (NPMG30). Cell degeneration, respiratory metabolism of cells by NAD and FAD emission, redox state, ROS production and finally follicular activation and viability were analyzed. For statistical analysis, SigmaPlot version 11.0 software (Systat Software, Inc., USA) was used, applying analysis of variance and Fisher's LSD post hoc test to compare means, with significance $P < 0.05$. The NPCA20 treatment showed higher levels of cell degeneration, higher ROS production and lower NAD(P)H and FAD emission, compared to CF and its respective CA20 treatment. The NPMG20 treatment showed a lower rate of cell degeneration, higher NAD and FAD production, lower ROS production and good follicular viability when compared to the controls and MG20. Thus, it is concluded that ZnO:0.5Ca NP at a concentration of 20 µg/mL impaired cell and follicular development, proposing cytotoxic effects in the culture of bovine ovarian cortex fragments. In the second experiment, the doping process was efficient in the ZnO:0.5Mg NP, providing a favorable environment for cellular and follicular development, as the doping process and the correct combination of ions reverse a possible toxicity scenario.

Key-words: nanoparticles, nanocrystals, follicular development, metal ions, MOIFOPA.

INTRODUÇÃO

As biotécnicas voltadas para a reprodução animal em bovinos estão sendo amplamente implantadas, tanto para aumento do plantel, melhoramento animal, como para estudos em busca de maior entendimento da fisiologia reprodutiva animal e como modelo para reprodução humana, para que assim melhores taxas de produção sejam alcançadas com uso mais eficiente do material genético da fêmea, uma vez que pouco mais de 0,1% das reservas foliculares são aproveitadas e o restante é perdido por atresia folicular, o que torna o potencial reprodutivo subutilizado (ALVES, 2014).

Com isso, a técnica de cultivo *in vitro* de tecido ovariano com manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA), vem sendo estudada no intuito de entender melhor a dinâmica folicular, para atingir ~~um~~ melhor desenvolvimento *in vitro* e preservação de folículos ovarianos na fase pré-antral (FIGUEIREDO et al., 2018). Assim esse material pode ser mais bem aproveitado, tornando mais eficiente o armazenamento de maior quantidade de material em bancos de germoplasma animal e humano, como por exemplo em casos de mulheres que passam por tratamentos quimioterápicos agressivos que interferem na função ovariana (BIZARRO-SILVA; SENEDA, 2021).

Em busca de melhores resultados na técnica citada acima, o ambiente *in vitro* deve mimetizar o máximo possível o ambiente *in vivo* e com isso algumas pesquisas são realizadas para melhorar a qualidade dos meios de cultivo com uso de suplementações necessárias ao desenvolvimento folicular, como íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Zn^{2+} . Estes minerais auxiliam na aquisição da competência meiótica (maturação) durante a foliculogênese (LIANG et al., 2011) e no desenvolvimento embrionário bovino, desde blastocisto até o nascimento (LIYOU et al., 2019). Mas a alteração da homeostase desses minerais, causada pela isquemia do cultivo *in vitro* pode trazer prejuízos ao desenvolvimento celular.

Para manter a homeostase e fornecer a suplementação necessária à célula, diversos tipos de nanopartículas (NPs) estão sendo testadas, pois sua pequena dimensão favorece a relação superfície/volume, resultando em maior biodisponibilidade e capacidade de absorção celular, gerando alterações bioquímicas (HUANG et al., 2017). Existem diversos tipos de NPs, com os nanocompósitos (NCs), formados por nanocristais no processo de dopagem, havendo uma alteração na sua estrutura física, propriedades e até

mesmo efeitos biológicos, o que potencializa suas funções ou diminui efeitos indesejáveis (BAE et al., 2005; XIA et al., 2011; ADELEYE et al., 2018).

Em vista desse conhecimento objetivou-se testar a influência da suplementação do meio de cultivo *in vitro* com NCs de óxido de zinco dopado com cloreto de magnésio (ZnO:0,5 Mg-MgO) e NCs de óxido de zinco dopado com cloreto de cálcio (ZnO:0,5 Ca-CaO), comparados a suplementação pura desses minerais Mg^{2+} e Ca^{2+} , em três concentrações 10, 20 e 30 $\mu\text{g/ml}$ na viabilidade de fragmentos de tecido ovariano bovino cultivados *in vitro*.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. OVOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

O ovário, uma das principais estruturas do trato reprodutivo da fêmea, o qual desenvolve funções endócrinas (esteróidogênica) com síntese e liberação hormonal, responsáveis por auxiliar no desenvolvimento do trato genital, desenvolvimento embrionário, implantação, parto, lactação, entre outras e exócrinas (gametogênica) com o desenvolvimento, maturação e liberação do gameta feminino (ovócito) (DALBIESTRAN et al., 2020). Em bovinos, é composto por córtex, na região mais superficial, com a presença das estruturas funcionais (foliculo e corpo lúteo) e na região mais interna, a medula, com a presença de vasos e nervos, responsáveis pela nutrição e sustentação ovariana.

Apesar da grande importância do ovário para o trato reprodutivo da fêmea, este apresenta uma baixa produtividade, por possuir grande população folicular ovariana pré-antral nos ovários, com variação estimada para bovinos *Bos indicus* e *Bos taurus* de 143.929 x 285.155 para fetos, 76.851 x 109.673 para novilhas e 39.438 x 89.577 para vacas (SILVA-SANTOS et al., 2011), porém, com reserva limitada, com ausência de neo formação durante a vida do animal, apesar do relato de presença de células tronco-germinativas no ovário (JOHNSON et al., 2004). Com o tempo, esses folículos são recrutados, mas 99,9% dessas estruturas não são aproveitadas, resultando em poucas ovulações durante a vida reprodutiva do animal, pois a maioria sofre atresia, um processo de morte celular, diminuindo esse estoque formado durante o desenvolvimento fetal, pelo processo de ovogênese e foliculogênese (COLLADO-FERNANDEZ et al., 2012).

Na maioria dos mamíferos, a ovogênese é dividida em 3 etapas: multiplicação, crescimento e maturação do gameta feminino. Esse processo tem início durante o desenvolvimento da vida fetal, no qual as células germinativas primordiais (CGP) migram da linha primitiva para o saco vitelínico, sofrem multiplicações e diferenciam-se em ovogônias, as quais passam por divisões mitóticas, crescem e se desenvolvem, dando início a primeira meiose na fase de prófase I, sendo chamados de ovócitos primários. A maturação, ainda no período fetal, ocorre nesse estágio de prófase I, o qual se divide em 5 fases (leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese), com uma pausa no desenvolvimento do ovócito primário no estágio de diplóteno da prófase I, processo esse aos 75 a 80 dias após a fecundação (MCNATTY, 1999; MOORE; PERSAUD, 2008; MONIRUZZAMAN; MIYANO, 2010). A retomada da maturação do ovócito primário ocorre com a chegada da puberdade e continuação da meiose I, em resposta a onda pré-ovulatória do hormônio luteinizante (LH), causando alterações nucleares e citoplasmáticas, passando a se chamar ovócito secundário, com liberação do primeiro corpúsculo polar e fim do processo de maturação. Este ovócito maturado se encontra apto para a fecundação, seguindo para a meiose II, na qual sofre uma segunda parada na etapa de metáfase II até que ocorra a fecundação, momento em que o ovócito completa a sua segunda divisão meiótica, com a extrusão do segundo corpúsculo polar, retomando sua configuração inicial ($2n$), com a interação do material genético materno e paterno, formando assim o zigoto, que dará origem ao embrião (SENEDA et al., 2021).

A foliculogênese ocorre em conjunto com a ovogênese, no momento em que as ovogônias são circundadas por células somáticas para formar os cordões corticais, que são os precursores dos folículos primordiais e continuam seu desenvolvimento em folículos primários, secundários, terciários e pré-ovulatórios, finalizando o processo com a ovulação de um ovócito maduro. A formação dessas estruturas, assim como na ovogênese, tem início aos 90 dias do desenvolvimento do feto bovino, com uma camada de células da granulosa, pavimentosas que envolvem o ovócito primordial, formando o folículo primordial, que correspondem a 95% dos folículos presentes no ovário de fêmeas jovens (ARAÚJO et al., 2010; SENEDA et al., 2021). Essas células permanecem neste estágio até que ocorra um estímulo para que continuem seu desenvolvimento, como a ação de fatores de crescimento tumorais (TGF), hormônio anti-mulleriano (AMH), ativinas, fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e fator de crescimento epidermal (EGF), os chamados mecanismos de ativação, que retiram o folículo de forma irreversível desse estágio de quiescência, agindo em receptores nas células da granulosa e ovócito,

estimulando alterações nucleares, citoplasmáticas e morfológicas, com deposição de camadas celulares no folículo, importantes para o crescimento e diferenciação do ovócito (WALKER; BIASE, 2020). Assim, as células pavimentosas dão início a alteração de sua morfologia para células cuboides, formando o folículo de transição e com sua diferenciação em folículo primário aos 140 dias de gestação.

As células foliculares continuam seu desenvolvimento e se multiplicam por mitoses, apresentando pelo menos duas camadas de células, em conjunto com a formação da zona pelúcida, células da teca, grânulos corticais e junções gap, que possibilitam a passagem de íons inorgânicos, pequenos metabólitos, nutrientes e os mensageiros para o interior das células (KIDDER; MHAWI, 2002), auxiliando no desenvolvimento e formação do folículo secundário aos 210 dias de gestação, finalizando o desenvolvimento dos folículos pré-antrais. A partir daí, ocorre a formação de uma cavidade (antro) preenchida por um líquido, dando início aos folículos antrais (VAN DEN HURK, 2000; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Esse líquido rico em substâncias provenientes do sangue e células que compõe os folículos, como hormônios esteroides, gonadotrofinas, fatores de crescimento, complexos proteicos e enzimas, auxilia no desenvolvimento folicular e ovocitário (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). O folículo antral, também chamado de terciário, apresenta várias camadas da granulosa e teca e passa por um processo de crescimento, seleção e dominância, formando o folículo pré-ovulatório com 250 dias de gestação, finalizando o período de desenvolvimento folicular fetal, com continuidade à última etapa do processo após o nascimento da fêmea, com a ovulação, processo esse que só ocorre com a entrada na puberdade (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Com isso, nota-se que o folículo ovariano é uma estrutura biológica complexa que necessita de comunicações parácrinas, autócrinas e endócrinas entre o ovócito, células somáticas, da teca e granulosa, para seu desenvolvimento, por ações de mecanismos bioquímicos e complexas cascatas de sinalizações como fosforilação, ligação de proteínas, liberação de cálcio, entre outras, resultando em um ovócito competente (MONNIAUX, 2016; BERNABÉ et al., 2020).

O estudo e entendimento desses processos é essencial para atingir a eficiência reprodutiva, com o aumento da disponibilidade de material genético de qualidade, acompanhando o crescente avanço das biotécnicas de reprodução assistida, tanto para humanos quanto animais de produção. Uma das formas de realizar esses estudos é com o aperfeiçoamento de técnicas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais.

1.2. CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS

Há anos a reprodução animal é considerada um dos fatores de maior importância para um bom retorno econômico da pecuária bovina, isso porque aliada a sanidade, nutrição e melhoramento genético, consegue aumentar a produção dos animais para o mercado. Em vista disso, as biotécnicas utilizadas na reprodução estão sempre em busca de melhores resultados, a fim de otimizar o uso do material genético presente no plantel (FERREIRA, 2010; MELLO et al., 2016; VERGARA et al., 2018). A eficiência no uso dessas biotécnicas voltadas para a reprodução assistida, podem gerar resultados positivos também para outras espécies como os humanos, com o uso do material de bovinos como modelo animal em pesquisas relacionadas, auxiliando no caso de tratamentos de infertilidade ou alternativas para os efeitos colaterais que os tratamentos de doenças como o câncer podem causar (FIGUEIREDO; LIMA, 2017).

Um dos modelos de pesquisas mais utilizados para o estudo da fisiologia reprodutiva e melhoria das biotécnicas é o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais isolados ou inclusos em fragmentos do córtex ovarino (cultivo *in vitro in situ*) como fonte de maior reserva de gameta feminino, pela técnica de manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA), com foco na preservação de folículos ovarianos na fase pré-antral (FIGUEIREDO et al., 2018). O'Brien et al. (2003), obtiveram sucesso no uso dessa técnica MOIFOPA em folículos primordiais de camundongo, demonstrando que ovócitos oriundos desses folículos cultivados *in vitro*, podem resultar em produção embrionária e até mesmo taxa de nascimento semelhante aos cultivados *in vivo*. Além disso De Sá et al. (2020), relataram a primeira gestação em cabras após o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos antrais precoces.

Essa técnica é composta de diversas etapas (multistep), o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais a partir de fragmentos do cortex ovariano, com a finalidade de diminuir a atresia celular que ocorre *in vivo* e retomar o desenvolvimento folicular; microdissecção dos folículos secundários e cultivo *in vitro* para seu desenvolvimento até o estágio antral; e por último, coleta dos ovócitos inclusos nesses folículos e submissão destes aos processos da produção *in vitro* de embriões (PIVE) (TELFER, 2008; McLAUGHLIN et al., 2018; TELFER, 2019). Uma grande variedade de sistemas de cultivo *in vitro*, com variações de suplementações de meios e métodos de cultivo, são estudados, no intuito de obter sucesso dessa técnica nas diversas espécies, diminuindo seus desafios como o estresse celular e consequente produção de espécies reativas de

oxigênio (EROs), que levam a ocorrência de morte celular (SILVA et al., 2017b; DE SÁ et al., 2020).

O método mais utilizado para esses estudos é o cultivo *in situ*, pois como os folículos ficam inclusos no fragmento de tecido ovariano, a interação celular entre os folículos e as células da teca e granulosa, podem auxiliar no crescimento e desenvolvimento, uma vez que o ambiente tridimensional que o tecido proporciona, favorece a absorção de nutrientes e manutenção da estrutura folicular (ABIR et al., 2006; GREEN; SHIKANOV, 2016), facilitando a ativação espontânea de folículos primordiais (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997; ARAÚJO et al., 2014). Além disso esse método é mais fácil e eficiente por não envolver o isolamento do folículo pré-antral e por trabalhar com quantidades maiores de folículos inclusos em um único fragmento ovariano.

Com isso, supõe-se que um modelo de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos eficiente, poderia auxiliar em um maior conhecimento da foliculogênese e consequentemente, melhoria da produção em biotécnicas reprodutivas. Isso poderia ter influência positiva na preservação de animais silvestres em extinção e na multiplicação de animais de interesse zootécnico, com maiores taxas de produção e manutenção de um banco com maior quantidade de material genético a ser explorado. Bem como na reprodução humana, como forma alternativa de manutenção de gametas viáveis após tratamentos agressivos de radioterapia e quimioterapia, os quais prejudicam a saúde dos gametas, ocasionando uma insuficiência ovariana prematura (FILATOV et al., 2016), funcionando como modelo de estudo humano de forma mais segura (YANG et al., 2020).

1.3. INFLUÊNCIA DOS ÍONS ZINCO, CÁLCIO E MAGNÉSIO NO CULTIVO CELULAR OVARIANO

Estudos com uso de suplementos no meio de cultivo *in situ in vitro* estão sendo realizados em busca de maior eficiência na técnica, na tentativa de aproximar cada vez mais o ambiente *in vitro* do *in vivo* e fornecer substratos importantes para o desenvolvimento celular, proporcionando um ambiente ideal para a ativação folicular e maturação ovocitária. Uma vez que diversos estudos demonstram que o fluido folicular, sofre diversas alterações em condições isquêmicas, apresentando influência na qualidade ovocitária (IWATA et al., 2005).

Em busca desses resultados, ao estudar o líquido folicular Payer (1975), constatou que a composição deste tem grande semelhança ao soro sanguíneo, uma vez que as camadas circundantes permitem a passagem por livre difusão de proteínas de até 500kDa,

com isso é mantido um equilíbrio das concentrações iônicas e metabólicas, com influência na qualidade folicular e ovocitária.

Tendo em vista essa semelhança, os íons metálicos que compõe o soro sanguíneo, são extremamente necessários para todos os organismos vivos. Algumas proteínas e enzimas contém ou necessitam de íons metálicos para desenvolverem seu papel, sendo indispensáveis em diversas reações catalíticas, hidrolíticas, redox e de isomerização (FRAUSTO; WILLIAMS, 1991; THOMSON; GRAY, 1992; LIPPARD; BERG, 1994; HANNA; DOUDNA, 2000). O Ca^{2+} , Mg^{2+} e Zn^{2+} são os íons encontrados mais facilmente e por isso mais estudados.

O cálcio (Ca^{2+}) é um dos componentes orgânicos presente no soro sanguíneo, de grande importância na reprodução e a queda da sua concentração pode prejudicar a fertilidade (BOLAND, 2003), devido seu papel na regulação do desenvolvimento ovocitário e aquisição da competência meiótica (maturação) durante a foliculogênese (LIANG et al., 2011). Também apresenta influência na esteróidogênese (WISE, 1987), com auxílio dos hormônios LH e folículo estimulante (FSH) que aumenta a produção de AMPc, com ação em vários processos bioquímicos, como a regulação do metabolismo celular e síntese de esteróides de pulsos hemodinâmicos dos folículos em desenvolvimento (SELSTAM et al., 1976; KOR; KHANGHAH; VEISI, 2013; CASARINI; CRÉPIEUX, 2019). Assim, quanto maior o folículo, maior o nível de Ca^{2+} no fluido folicular, devido a ativação do armazenamento intracelular e influxo de cálcio transmembrana, auxiliando na diferenciação celular (FLORES et al., 1998). A concentração de Ca^{2+} varia de acordo com a passagem desse íon presente no citoplasma para o interstício e vice-versa, via proteínas reguladoras que estão presentes na membrana plasmática, as quais formam canais, bombas e trocadores (KARLSTAD; SUN; SINGH, 2012). Qualquer descontrole na regulação dessas trocas, geram prejuízos no desenvolvimento, com chances de morte celular (CLAPHAM, 2007; NEHER; SAKABA, 2008). O excesso de Ca^{2+} em organelas como as mitocôndrias, gera uma despolarização do potencial mitocondrial com acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que pode levar a senescência e apoptose celular (GIORGI et al., 2012; IVANOVA et al., 2017), inclusive em células de câncer de ovário. Já a falta de Ca^{2+} intracelular pode desencadear um desequilíbrio redox, com danos a membrana intracelular (ZHANG; LI, 2017).

Outro componente de grande importância na reprodução por manter a fisiologia e equilíbrio celular, são os íons de magnésio (Mg^{2+}), que quando suplementados no meio

de cultivo celular, alteram diretamente sua concentração no fluido folicular, transportado através da membrana plasmática para o interior das células (IWATA et al., 2005; PILCHOVA et al., 2017). Uma vez presente no citoplasma, este é armazenado principalmente nas mitocôndrias, para o auxílio na ativação ou inibição de enzimas e proteínas relacionadas à ligação de ATP, metabolismo do ácido nucleico e estabilidade do RNA (SCHMITZ, DEASON, PERRAUD, 2007; MASTROTOTARO et al., 2016; PILCHOVA et al., 2017), manutenção do status antioxidante da célula, regulação no ciclo celular e apoptose (WOLF; CITTADINI, 1999). Por essa alteração no metabolismo celular, o Mg^{2+} é geralmente utilizado em soluções para preservação de órgãos. Segundo Iwata et al. (2005), houve um aumento na concentração de Mg^{2+} fluido folicular, com aumento na taxa de sobrevivência das células da granulosa nos folículos e melhora no desenvolvimento ovocitário, após a suplementação da solução de transporte do ovário com Mg^{2+} . Com isso percebe-se que este íon apresenta grande estímulo na maturação meiótica de ovócitos (BELLE et al., 1986), no desenvolvimento embrionário bovino, desde blastocisto, durante seu desenvolvimento após transferência, até o nascimento (AN et al., 2019). As baixas concentrações de Mg^{2+} no fluido folicular, assim como o Ca^{2+} , citado acima, impedem a retomada da meiose (LEIBFREID; FIRST 1979, JAGIELLO et al., 1982). Além disso, pode diminuir a integridade e a função da membrana e aumentar a exposição da célula ao estresse oxidativo (DICKENS et al., 1992). Já a suplementação de Mg^{2+} , inibe apoptose celular (PEREIRA et al., 2002; MARTIN et al., 2003), acelera a maturação nuclear ovocitária, com melhora na competência do desenvolvimento, até a fecundação *in vitro* (IWATA et al., 2005). Além disso, esse auxílio no desenvolvimento continua até o estágio inicial do embrião (LANE et al. 1998; IWATA et al., 2005), com aumento no número total de células de blastocistos, resultando em melhoria na qualidade celular.

Tanto o Ca^{2+} como o Mg^{2+} , mantem uma relação na manutenção da homeostasia do ambiente folicular. Estes apresentam atividade antagonica, na qual a diminuição do Mg^{2+} facilita a ação do Ca^{2+} .

O Zinco (Zn^{2+}), também apresenta grande influência no desenvolvimento folicular, ovocitário e embrionário. Este íon, assim como o Ca^{2+} e Mg^{2+} , são estocados em organelas intracelulares ou difundem do espaço extracelular e são carregados por proteínas alvo nas vias de sinalização (DUDEV; LIM, 2003; FUKADA; KAMBÉ, 2014). Dessa forma, esse íon consegue realizar suas ações como aumento da concentração nos momentos de meiose I, causando a reativação de células quiescentes em baixos níveis

de Zn^{2+} e atinge o pico de concentração em metáfase II da ovogênese, liberando íons para o ambiente extracelular, causando a segunda parada meiótica, quando o oócito está apto a ser fecundado (KIM et al., 2010; BERNHARDT et al., 2012; LO et al., 2020). Após a fecundação, a concentração de Zn^{2+} diminui, auxiliando com o bloqueio da polispermia (KIM et al., 2011; QUE et al., 2017). Além disso a manutenção dessa homeostase auxilia nas primeiras divisões embrionárias (KONG et al., 2015). Segundo Chen et al. (2023), o Zn^{2+} aumenta durante o desenvolvimento folicular, sendo o metal de transição mais predominante nos folículos iniciais e sua restrição durante esse momento leva a apoptose de células, reduzindo o número de folículos secundários. Já a suplementação com Zn^{2+} nesta mesma pesquisa, ativou o crescimento e proliferação de células somáticas.

Esses íons já estão normalmente presentes no fluido folicular, mas no caso de fragmentos de tecido isquêmicos, a suplementação ocorre com intuito de aproximar ao máximo do ambiente *in vivo*. Como citado acima, de acordo com a variação dos íons, estes apresentam ações diferentes, com isso, na tentativa de melhorar o fornecimento dessas substâncias e minimizar os possíveis danos que poderiam ser causados com a alteração da homeostasia do ambiente, novos veículos de oferta estão sendo estudados.

1.4. NANOTECNOLOGIA

O uso de nanopartículas (NPs) no cultivo celular *in vitro* tem sido amplamente estudado em análise de respostas biológicas e biocompatibilidade de diferentes materiais (PETERS, 2013), uma vez que essas moléculas de pequenas dimensões (1-100 nanômetros), funcionam para o transporte de fármacos, minerais, sondas e proteínas, diversas maneiras. A pequena dimensão favorece a relação superfície/volume, resultando em maior biodisponibilidade e capacidade de absorção dessas substâncias pelas células (SILVA et al., 2017b), resultando em maior superfície de contato e interação com biomoléculas das células alvo intracelulares e presentes na parede celular, gerando alterações bioquímicas (MODY et al., 2010; LANDSIEDEL et al., 2012; HUANG et al. 2017).

Para a síntese das NPs, diferentes técnicas são utilizadas, como por exemplo o processo de dopagem, que promove uma adição de impurezas biocompatíveis e específicas de forma controlada a estrutura cristalina de um semicondutor, alterando sua estrutura física, suas propriedades e conseqüentemente seus efeitos biológicos, com objetivo de potencializar suas funções ou diminuir efeitos indesejáveis (BAE et al., 2005;

XIA et al., 2011; ADELEYE et al., 2018), podendo apresentar até mesmo outras características nesse formato conhecido como nanocompósito.

Na produção desses NCs, são muito utilizadas como base, NPs metálicas como óxido de prata (AgO), óxido de ouro (Au₂O₃), dióxido de titânio (TiO₂), óxido de zinco (ZnO), óxido de magnésio (MgO) e óxido de cobre (CuO) (MI et al., 2018), devido sua competência em ser conjugado e sintetizado. Estes óxidos metálicos inorgânicos, apresentam grande capacidade como agentes antimicrobianos (SAWAI, 2003), sendo utilizados em embalagens do mercado alimentício.

Os nanocristais de ZnO são materiais de baixo custo, duráveis, baixa toxicidade e alta biocompatibilidade, segundo a agência americana de regulação de alimentos e drogas (Food and Drug Administration - FDA) e versáteis, com alta atividade fotocatalítica, estabilidade química e física e absorção ultravioleta (UV) (WARHEIT, 2008; TANKHIWALE; BAJPAI, 2012). Os quais, apresentam capacidade de induzir estresse oxidativo na membrana de células cancerígenas e de patógenos, aderência dos NCs por eletrostática na superfície do patógeno, gerando bloqueio físico dos canais de transporte, inibindo o metabolismo celular, causado também pela penetração dos nanocompósitos na célula, proporcionando um efeito antineoplásico e atividade antibacteriana (SAWAI, 2003; PREMANATHAN et al., 2011; PATI et al., 2014; DRYDEN, 2017), sendo assim, uma forma competente de bloqueio de crescimento microbiano como bactérias, vírus e fungos (PUSPASARI et al., 2022).

Por outro lado, estudos recentes demonstram que o uso em geral de NPs estão causando desregulações endócrinas e induzindo estresse oxidativo em diversos tecidos (IAVICOLI ET AL., 2013; DAYEM ET AL., 2017; FLETCHER ET AL., 2022; SAMROT; PRAKASH, 2023). Em cultivo de tecido ovariano, também tem demonstrado que pode haver um acúmulo dessas estruturas em folículos em crescimento (SCHÄDLICH ET AL., 2012; SANTACRUZ-MÁRQUEZ; SANTOS; HERNÁNDEZ-OCHOA, 2021), causando certa toxicidade. Segundo Saber et al., 2020 e Santacruz-Márquez et al., 2020, as NPs de ZnO, conseguem penetrar nas células ovarianas, após 24h de exposição, gerando alguns prejuízos as células, como redução da atividade metabólica e crescimento folicular, resultando em alterações na morfologia folicular. Uma alternativa para tentar evitar esses prejuízos, é o uso de métodos diferentes de síntese, como a dopagem, citada acima, que altera a estrutura das NPs e consequentemente suas propriedades, melhorando as interações nas interfaces de fase,

diminuindo efeitos indesejáveis. Assim, incrementos em nanoescalas, podem gerar novas funções.

2. OBJETIVO GERAL

Testar a influência da suplementação do meio de cultivo *in vitro* com NCs de óxido de zinco dopado com cloreto de magnésio (ZnO:0,5 Mg-MgO) e NCs de óxido de zinco dopado com cloreto de cálcio (ZnO:0,5 Ca-CaO), comparados a suplementação pura desses minerais Mg^{2+} e Ca^{2+} , em três concentrações 10, 20 e 30 $\mu g/ml$ na viabilidade de fragmentos de tecido ovariano bovino cultivados *in vitro*.

3. HIPÓTESE

Uma vez que o tecido não se encontra em um ambiente propício ao seu desenvolvimento, se torna necessária a suplementação do meio e/ou alteração no método de cultivo para que o ambiente *in vitro* consiga se aproximar cada mais mais do ambiente *in vivo*. Para que assim, sejam alcançados bons resultados na ativação, desenvolvimento folicular e conseqüentemente, produção de um ovócito competente. Baseado nesses conceitos a hipótese é que as nanopartículas podem auxiliar na disponibilização de minerais essenciais ao desenvolvimento folicular e ovocitário, facilitando sua absorção, tornando seu metabolismo mais eficiente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. REAGENTES

Os reagentes utilizados neste estudo foram provenientes da Sigma (Sto Louis, MO, USA), a menos que indicado de outra forma. As nanopartículas compostas por óxido de zinco, dopadas com óxido de magnésio e óxido de cálcio, foram produzidas pelo laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU, Uberlândia, MG, Brasil).

4.2. COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

O presente estudo foi submetido e isento de autorização de protocolo de Comitê de Ética sob número de registro **80/2022/CEUA/PROPP/REITO**, uma vez que o material utilizado não foi coletado a partir de manipulação direta de animais.

4.3. AQUISIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

A síntese das nanopartículas de ZnO:0,5Ca-CaO (ZnO:0,5Ca) e ZnO:0,5Mg-MgO (ZnO:0,5Mg) foram realizadas no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS) do Instituto de Física e no Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho no Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia. Os NCs foram sintetizados pelo método de coprecipitação, que está sob pedido de patente (BR 10 2018 007714 7) e gentilmente cedidas por pelo professor Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho para execução deste trabalho. As nanopartículas foram preparadas em uma solução estoque e diluídas nos meios de cultivo para a concentração final de 10, 20 e 30 µg/mL.

4.4. COLHEITA DO MATERIAL

Os ovários foram coletados de vacas com raça, idade e peso variados, em abatedouro no município de Morro Agudo-SP. O transporte do frigorífico ao Laboratório de Reprodução Humana no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), ocorreu em caixa térmica, com soro fisiológico 0,9% suplementado com 100 µg/mL de amicacina, resfriado à 4°C, em um período máximo de 4 horas.

4.5. DESENHO EXPERIMENTAL 1

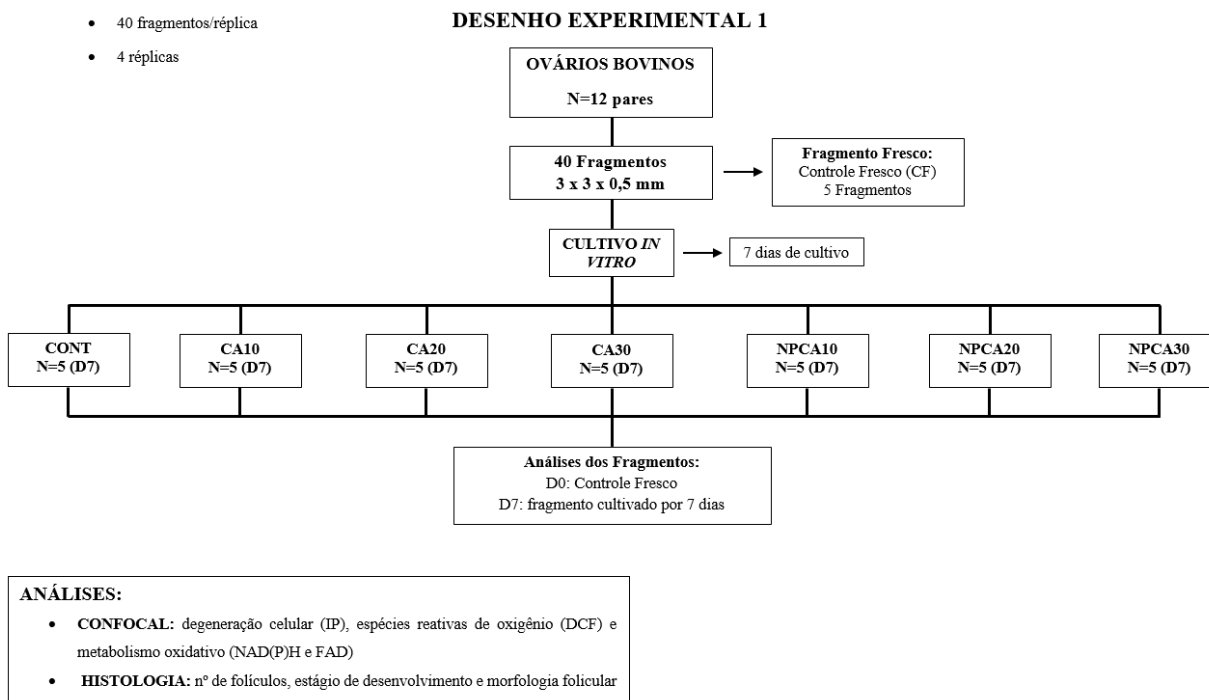


Figura 1: Esquema experimental de cultivo *in vitro* de fragmento do córtex ovariano bovino em meio suplementado com diferentes concentrações teste de cloreto de cálcio e nanopartículas de óxido de zinco dopadas com óxido de cálcio.

4.6. DESENHO EXPERIMENTAL 2

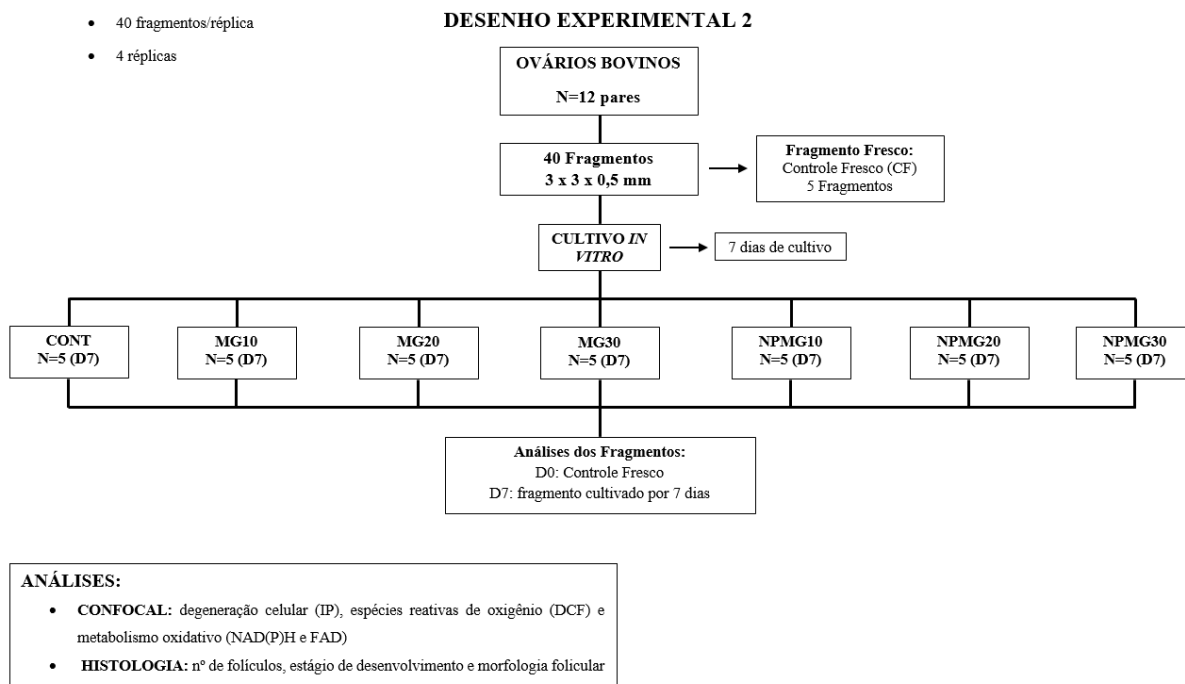


Figura 2: Esquema experimental de cultivo *in vitro* de fragmento do córtex ovariano bovino em meio suplementado com diferentes concentrações teste de cloreto de magnésio e nanopartículas de óxido de zinco dopadas com óxido de magnésio.

4.7. OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS OVARIANOS - EXPERIMENTOS 1 E 2

No laboratório, os ovários foram lavados em álcool 70% e posteriormente, lavados com soro fisiológico 0,9% suplementado com 100 µg/mL de amicacina, resfriado à 4°C. Em seguida, com o auxílio do equipamento Thomas Stadie-Riggs Tissue Slicer (Thomas Scientific®, NJ, USA), os ovários foram fragmentados com espessura aproximada de 3 x 3 x 0,5mm. Posteriormente, esses fragmentos foram transferidos para meio de lavagem Minimum Essential Medium Eagle modificado (α MEM) com 25 mM de HEPES, suplementado com 100 µg/mL de amicacina, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 µg/mL de penicilina, onde permaneceram até o momento da seleção, no qual foram cortados em tamanho padrão de 1 x 1cm e utilizados apenas os fragmentos de melhor qualidade, com boa quantidade de folículos ovarianos pré-antrais.

Os fragmentos foram distribuídos de forma aleatória afim de diluir o efeito animal nos tratamento que compõem 2 experimentos.

Experimento 1: Controle Fresco (CF), Controle (CONT), 10 µg/mL de cloreto

de cálcio (CaCl_2) (CA10), 20 $\mu\text{g/mL}$ de CaCl_2 (CA20), 30 $\mu\text{g/mL}$ de CaCl_2 (CA30), 10 $\mu\text{g/mL}$ de NP de ZnO:0,5Ca (NPCA10), 20 $\mu\text{g/mL}$ de NP de ZnO:0,5Ca (NPCA20), 30 $\mu\text{g/mL}$ de NP de ZnO:0,5Ca (NPCA30) (Figura 1).

Experimento 2: Controle Fresco (CF), Controle (CONT), 10 $\mu\text{g/mL}$ de cloreto de magnésio (MgCl_2) (MG10), 20 $\mu\text{g/mL}$ de MgCl_2 (MG20), 30 $\mu\text{g/mL}$ de MgCl_2 (MG30), 10 $\mu\text{g/mL}$ de NP de ZnO:0,5Mg (NPMG10), 20 $\mu\text{g/mL}$ de NP de ZnO:0,5Mg (NPMG20), 30 $\mu\text{g/mL}$ de NP de ZnO:0,5Mg (NPMG30) (Figura 2).

De cada tratamento, 2 fragmentos foram destinados para análise histológica e 3 fragmentos para análise confocal (total de 5 fragmentos por tratamento em cada réplica). A coleta dos fragmentos foram realizadas em 2 momentos: antes de serem cultivados (dia 0 - D0) e com sete dias de cultivo (dia 7 - D7). Os fragmentos selecionados no D0 para o controle fresco, foram imediatamente corados e fixados para avaliação confocal e fixados para avaliação histológica. Por fim, foram realizadas 4 réplicas deste experimento.

4.8. CULTIVO *IN VITRO* - EXPERIMENTOS 1 E 2

Cada fragmento selecionado foi distribuído individualmente, para os respectivos tratamentos de cada experimento, em placas de cultivo de 24 poços (Corning, NY, USA) que continham 500 μL de meio de cultivo, composto de α MEM suplementado com 1% de BSA, ITS (10 $\mu\text{g/mL}$ insulina, 5,5 $\mu\text{g/mL}$ transferrina, 4,0 ng/mL selênio, LifeTechnologies Inc., Grand Island, NY, USA), 3 mM de glutamina, 2 mM de hipoxantina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de amicacina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de penicilina (PAES et al., 2016).

Para o experimento 1 foi acrescentado CaCl_2 e NPs de ZnO:0,5Ca ao meio de cultivo nas concentrações de 10, 20 e 30 $\mu\text{g/mL}$. No experimento 2 foi acrescentado MgCl_2 e NPs de ZnO:0,5Mg ao meio de cultivo nas concentrações de 10, 20 e 30 $\mu\text{g/mL}$.

O cultivo foi realizado em estufa com 5% de CO_2 , à 38,5°C durante o período de 07 dias, com troca parcial do meio a cada 2 dias. Todas as análises foram realizadas no dia da coleta D0 e D7.

4.9. AVALIAÇÕES DOS FRAGMENTOS OVARIANOS – EXPERIMENTOS 1 E 2

4.9.1. MICROSCOPIA CONFOCAL

Foi avaliada oxidação e viabilidade do tecido ovariano após os diferentes tipos de

tratamentos. Para isso, foi utilizado 2 fragmentos de cada tratamento, destinados para análise de intensidade de fluorescência, lavados em solução PBS com 5% soro fetal bovino (SFB) e corados em solução com 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de 2'7'- diclorodihidrofluoresceína (DCF, H2DCDFA, $\lambda = 485\text{-}530\text{ nm}$ – verde) por 30 minutos e mais 15 minutos em solução com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de iodeto de propídeo (IP, $\lambda = 536\text{-}620\text{ nm}$ – vermelho). Finalizado este processo, os fragmentos foram fixados em paraformaldeído 4% durante 30 minutos e armazenados em PBS, a 4°C. Foi analisada a intensidade de fluorescência (pixels) em diferentes profundidades teciduais, com secções realizadas em intervalos de 8 μm com média de 10 secções em Z-Stack (FABBRI et al., 2014), no aumento de 20x, com a utilização de microscópio invertido confocal LSM 510 Meta (Oberkochen, Alemanha) do Laboratório de Análise de Imagem da Universidade Federal de Uberlândia. As imagens foram salvas no programa Zen 2008 instalado ao microscópio e os dados numéricos da intensidade de fluorescência utilizados nas análises estatísticas.

Também foi avaliado o metabolismo celular oxidativo com uso de 1 fragmento de cada tratamento, destinados para análise de intensidade de autofluorescência do dinucleotídeo de flavina adenina oxidado (FAD, $\lambda = 490\text{-}590\text{ nm}$ – verde) e dinucleotídeo reduzido de nicotinamida adenina (fosfato) (NAD(P)H, $\lambda = 420\text{-}520\text{ nm}$ – azul), seguindo o mesmo padrão utilizado para as imagens de IP e DCF, mantidos em meio de lavagem aquecido a 37°C para transporte até o local de análise. As imagens foram capturadas usando Microscópio Confocal (Confocal Leica TCS SP5, Leica, Microsystems, Mannheim, Alemanha) do Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC) que está situado no Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

As intensidades de fluorescência de todas as imagens da análise confocal, foram quantificadas usando o software Image J (National Institutes of Health). As medições dos números de pixels emitidos pelas fluorescências, foram realizadas em 5 campos amostrais de cada imagem, além do background da lâmina.

4.9.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Foi avaliada a viabilidade folicular, número de folículos por fragmento, classificação quanto ao estágio de desenvolvimento e classificação morfológica em que os folículos foram considerados normais ou degenerados conforme padrão descrito por Alves et al. (2015). Para a análise de viabilidade, foi observado a coloração nuclear,

organização das células da granulosa e aspecto do citoplasma. Assim, o folículo é considerado degenerado, quando apresenta pelo menos 2 características como núcleo picnótico, células da granulosa desorganizadas e separadas da membrana basal e/ou retração citoplasmática. Quanto ao estágio de desenvolvimento é observado o tamanho do folículo, morfologia celular, quantidade de camadas de células da granulosa e presença ou ausência de antro, classificados como: primordial (ovócito imaturo no centro do folículo, circundado por uma camada de células pavimentosas da pré-granulosa); transição (ovócito imaturo com mudança morfológica das células da granulosa pavimentosas para cubóide); primário (ovócito imaturo e central rodeado por uma camada de células da granulosa de formato cubóide) e secundário (ovócito imaturo rodeado por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cubóide) (Figura 3).

Foram destinados 2 fragmentos de cada tratamento para a análise histológica, fixados em paraformaldeído a 4%, armazenados em álcool 70% e encaminhados para preparação histológica padrão (desidratação e inclusão em parafina). As amostras foram seccionadas a 5µm de espessura (ALVES et al.,2015) e coradas com hematoxilina e eosina (HE). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Nikon, Tóquio, Japão) com um aumento de 40x. Todas as avaliações e medições foram realizadas por um único operador nos Laboratórios de Histologia e Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia.

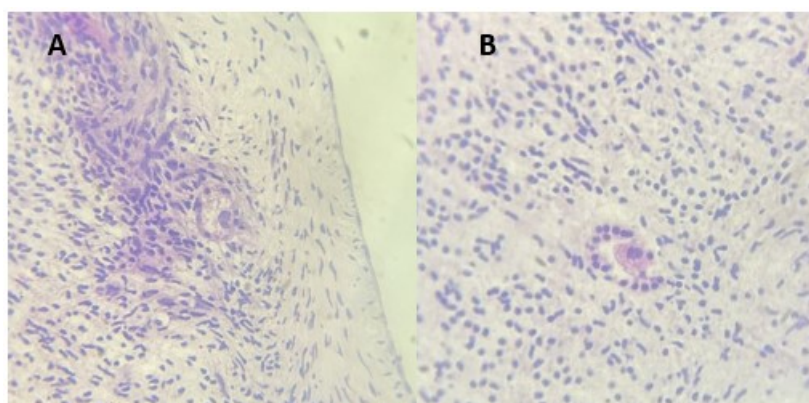


Figura 3. Ilustração histológica da viabilidade de folículos ovarianos no córtex de ovário bovino. Folículo de transição viável (A), folículo de transição degenerado (B).

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no software SigmaPlot versão 11.0 (Systat Software, Inc., EUA). Testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade

de variância (Levene) foram avaliados previamente. A análise de variância seguido pelo teste post hoc de Fisher LSD foi utilizada para a comparação de médias. Os dados são apresentados na forma de média e erro padrão da média (\pm epm) com significância estatística definida como $P < 0,05$ (bilateral).

5. RESULTADOS

Este estudo foi pioneiro no uso de NP ZnO:0,5Ca e ZnO:0,5Mg no cultivo *in vitro* de fragmentos de tecido ovariano. Para isso, foram utilizados 20 fragmentos de córtex de ovário bovino por tratamento, totalizando 280 fragmentos, sendo 112 destinados para análise histológica e 168 para análise confocal de viabilidade, oxidação do tecido e metabolismo celular oxidativo.

5.1. EXPERIMENTO 1

Para este experimento foram analisados os resultados de 6 grupos tratados, sendo eles, CA10, CA20, CA30, NPCA10, NPCA20 e NPCA30, mais 2 grupos controle, sendo estes o fresco em D0 (CF) e em D7 (CONT), totalizando 160 fragmentos analisados.

5.1.1. MICROSCOPIA CONFOCAL

Para as análises de microscopia confocal, foram utilizadas as probes IP, DCF e análise de autofluorescência de NAD(P)H e FAD.

Nas análises de viabilidade celular com uso de IP, o tratamento NPCA20 apresentou maior degeneração celular ($P < 0,05$) quando comparado ao tratamento CA20, CF e CONT (Tabela 1).

Tabela 1. Degeneração celular medida pela intensidade de fluorescência (pixels) emitida pelo iodeto de propídeo (I.P.) nos fragmentos de cortex ovariano bovino nos diferentes tratamentos de CA e NPCA, em D0 e D7.

I.P (Média ± EPM)		
CF = 267,75 ± 33,65		
CONT = 308,12 ± 45,85		
	MÉDIA	EPM
CA10	310,53 ^A	36,39
CA20	219,61 ^{B#}	26,47
CA30	230,90 ^{AB}	20,31
NPCA10	289,25 ^{AB}	26,94
NPCA20	426,41 ^{C#*}	32,81
NPCA30	239,25 ^{AB}	23,63

^{AB,C} difere na coluna (P<0,05); * difere do CF (P<0,05); # difere do CONT (P<0,05)

CF = controle fresco D0 / CONT = controle D7 / EPM = erro padrão da média

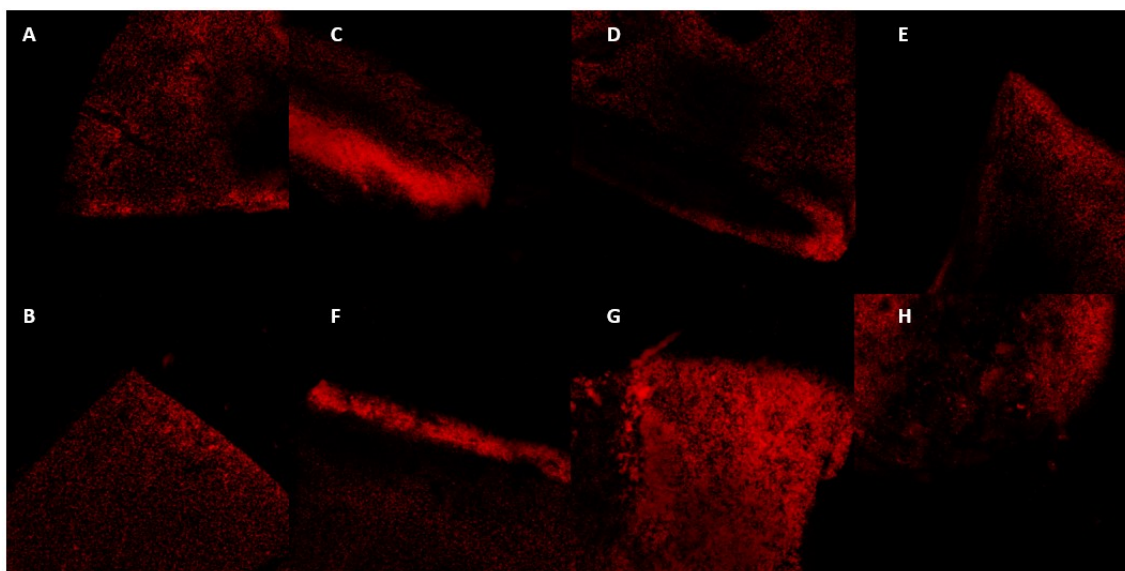


Figura 4. Intensidade de fluorescência emitida após o cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano bovino corados por IP em relação aos diferentes tratamentos (A) CF; (B) CONT; (C) CA10; (D) CA20; (E) CA30; (F) NPCA10; (G) NPCA20; (H) NPCA30.

Os resultados de emissão de espécies reativas de oxigênio (EROs) vão de encontro com os resultados citados acima, no qual apenas o tratamento NPCA20 apresentou maior produção de EROs quando comparado ao CF e ao CA20 (P<0,05). Além disso, quando comparamos os tratamentos, as maiores concentrações de Ca²⁺ (CA20 e CA30) emitiram

menor quantidade de EROs, comparados ao CA10, assim como a maior concentração de NP ($P < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Emissão de EROs medida pela intensidade de fluorescência (pixels) emitida pelo DCF nos fragmentos de córtex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de CA e NPCA, em D0 e D7.

DCF (Média ± EPM)		
CF = 147,72 ± 21,55		
CONT = 179,94 ± 27,31		
	MÉDIA	EPM
CA10	197,30 ^{AC}	22,87
CA20	138,66 ^B	16,27
CA30	139,01 ^B	14,73
NPCA10	181,89 ^{ABC}	19,53
NPCA20	231,94 ^{C*}	27,35
NPCA30	133,38 ^B	16,82

^{A,B} difere na coluna ($P < 0,05$); ^{*}difere do CF ($P < 0,05$); [#]difere do CONT ($P < 0,05$)

CF = controle fresco D0 / CONT = controle D7 / EPM = erro padrão da média

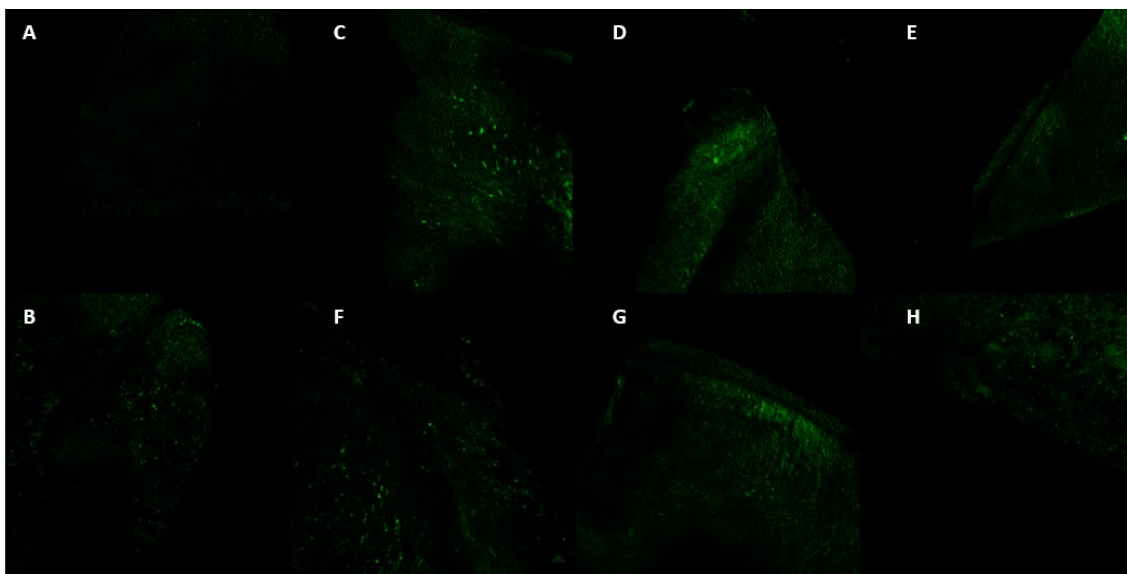


Figura 5. Intensidade de fluorescência emitida após o cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano bovino corados por DCF em relação aos diferentes tratamentos (A) CF; (B) CONT; (C) CA10; (D) CA20; (E) CA30; (F) NPCA10; (G) NPCA20; (H) NPCA30.

O estado redox mitocondrial e citoplasmático das células, foi observado pela medida de NAD(P)H e FAD. Em relação ao NAD(P)H o tratamento CA20 apresentou maior expressão quando comparado a sua respectiva NP e ao CF ($P < 0,05$). Além disso, o tratamento CA10 também apresentou maior emissão de NAD(P)H quando comparado ao CF ($P < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Níveis de emissão de NAD(P)H medida pela autofluorescência (pixels) nos fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de CA e NPCA, em D0 e D7.

NAD(P)H (Média ± EPM)		
CF = 25,14 ± 3,07		
CONT = 104,24 ± 17,03		
	MÉDIA	EPM
CA10	79,62 ^{AB*}	7,35
CA20	93,68 ^{B*}	8,87
CA30	65,77 ^{AB}	6,56
NPCA10	59,44 ^{AB}	7,94
NPCA20	53,06 ^A	5,65
NPCA30	57,26 ^A	8,11

^{AB} difere na coluna ($P < 0,05$); *difere do CF ($P < 0,05$); #difere do CONT ($P < 0,05$)
 CF = controle fresco D0 / CONT = controle D7 / EPM = erro padrão da média

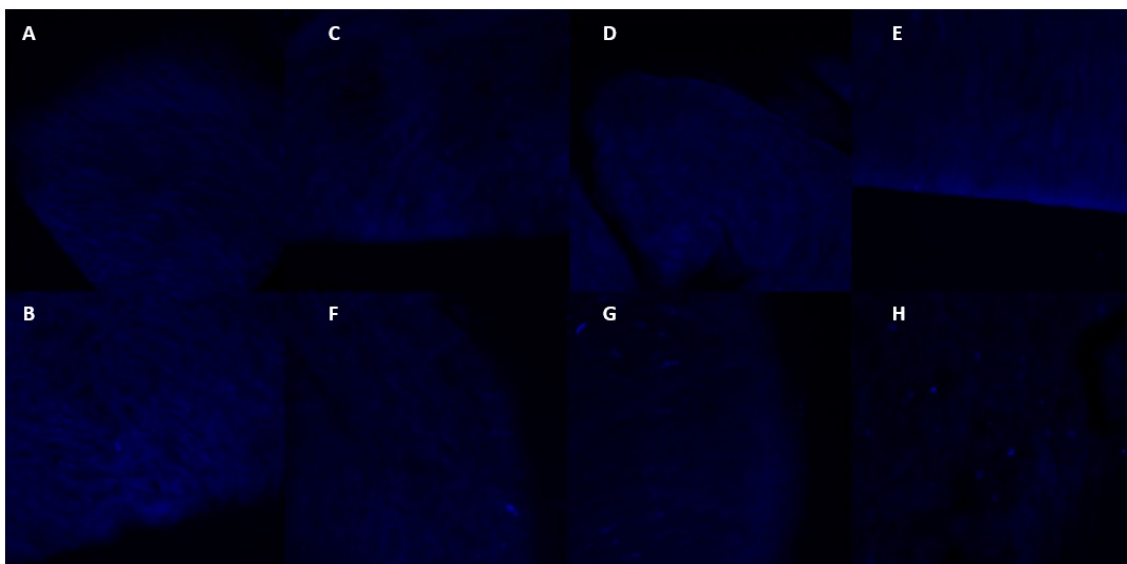


Figura 6. Intensidade de autofluorescência NAD emitida após o cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano bovino em relação aos diferentes tratamentos (A) CF; (B) CONT; (C) CA10; (D) CA20; (E) CA30; (F) NPCA10; (G) NPCA20; (H) NPCA30.

Já na emissão de FAD, o tratamento CA20 apresentou maior resultado quando comparado ao NPCA20 ($P < 0,05$). Além disso, podemos observar que conforme a concentração de Ca^{2+} aumenta, temos uma diminuição na emissão de FAD ($P < 0,05$). E os níveis de FAD do tratamento CA10 foram mais altos do que o CF ($P < 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Níveis de emissão de FAD medida pela autofluorescência (pixels) nos fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de CA e NPCA, em D0 e D7.

FAD (Média \pm EPM)		
CF = 24,28 \pm 1,78		
CONT = 45,37 \pm 3,60		
	MÉDIA	EPM
CA10	54,22 ^{A*}	8,75
CA20	51,76 ^{AB}	8,13
CA30	37,31 ^{BC}	4,47
NPCA10	42,30 ^{ABC}	4,31
NPCA20	32,06 ^C	4,74
NPCA30	32,40 ^C	2,85

^{AB} difere na coluna ($P < 0,05$); *difere do CF ($P < 0,05$); #difere do CONT ($P < 0,05$)

CF = controle fresco D0 / CONT = controle D7 / EPM = erro padrão da média

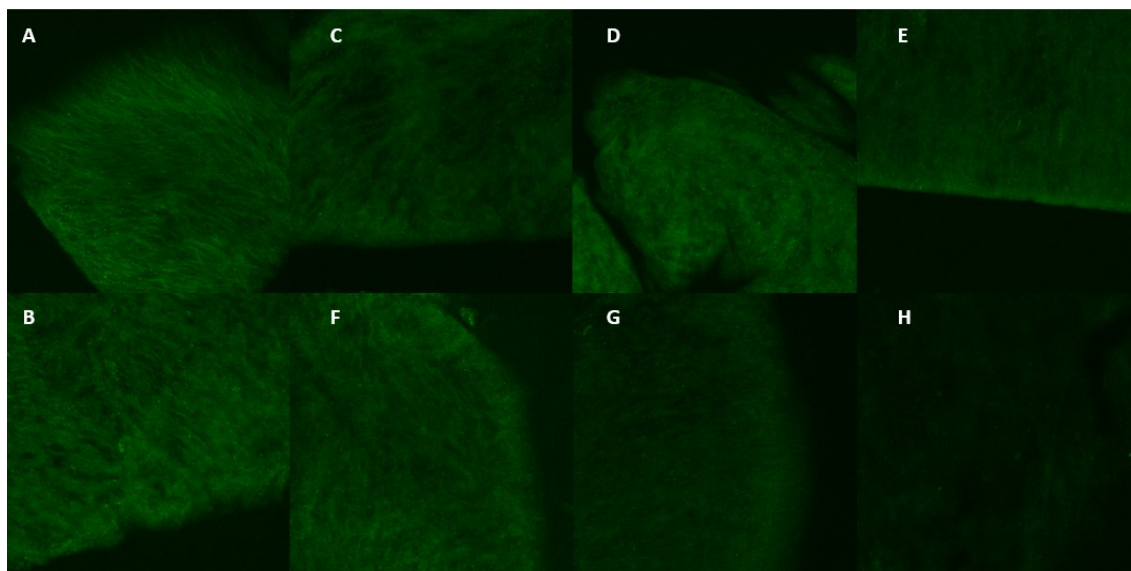


Figura 7. Intensidade de autofluorescência FAD emitida após o cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano bovino em relação aos diferentes tratamentos (A) CF; (B) CONT; (C) CA10; (D) CA20; (E) CA30; (F) NPCA10; (G) NPCA20; (H) NPCA30.

Foi realizada também a análise de relação de autofluorescência de logFAD: NAD(P)H, e não foi observado nenhuma diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação entre os níveis de emissão do potencial redox logFAD: NAD(P)H medida pela autofluorescência (pixels) nos fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de CA e NPCA, em D0 e D7.

logFAD: NAD(P)H (Média ± EPM)		
CF = 1,66 ± 0,20		
CONT = 0,70 ± 0,14		
	MÉDIA	EPM
CA10	0,94	0,25
CA20	0,66	0,14
CA30	0,69	0,13
NPCA10	1,03	0,24
NPCA20	0,66	0,12
NPCA30	0,87	0,20

^{AB} difere na coluna (P<0,05); *difere do CF (P<0,05); #difere do CONT (P<0,05)
CF = controle fresco D0 / CONT = controle D7 / EPM = erro padrão da média

5.1.2. HISTOLOGIA

Foram analisadas 240 secções histológicas com um total de 1.456 folículos inclusos em 32 amostras de fragmentos de córtex ovariano de bovinos.

Na tabela 6 está descrita a proporção de folículos viáveis dos tratamentos propostos após 7 dias de cultivo *in vitro* comparando com o CF em D0 e CONT em D7. Com isso podemos perceber que com exceção dos tratamentos CA30 e NPCA30, todos os outros apresentaram redução na taxa de folículos viáveis, quando comparados ao CF ($P < 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6. Proporção (Média \pm EPM) de folículos viáveis em fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de CA e NPCA, em D0 e D7.

Viabilidade Geral % (Média \pm EPM)		
	MÉDIA	EPM
CF	84,22 ^A	4,37
CONT	71,32 ^B	2,81
CA10	69,63 ^B	4,33
CA20	65,85 ^B	4,66
CA30	74,88 ^{AB}	6,13
NPCA10	66,21 ^B	5,23
NPCA20	64,11 ^B	4,12
NPCA30	75,31 ^{AB}	4,90

^{AB} difere na coluna ($P < 0,05$)

CF = controle fresco D0 / CONT = controle D7 / EPM = erro padrão da média

Houve uma alta taxa de ativação folicular, com maior taxa nos tratamentos em geral, quando comparados ao CF ($P < 0,05$), com redução apenas no tratamento NPCA20 quando comparado ao CA20 (Tabela 7).

Tabela 7. Proporção (Média \pm EPM) de folículos ativados em fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de CA e NPCA, em D0 e D7.

Ativação folicular % (Média \pm EPM)		
	MÉDIA	EPM
CF	74,68 ^A	4,45
CONT	97,86 ^{BC}	1,23
CA10	100,00 ^C	0,00
CA20	100,00 ^C	0,00
CA30	100,00 ^C	0,00
NPCA10	99,11 ^C	0,89
NPCA20	94,72 ^B	2,60
NPCA30	98,02 ^{BC}	1,01

^{AB} difere na coluna (P<0,05)

CF = controle fresco D0 / CONT = controle D7 / EPM = erro padrão da média

5.2. EXPERIMENTO 2

Para este experimento foram analisados os resultados de 6 grupos tratados, sendo eles, MG10, MG20, MG30, NPMG10, NPMG20 e NPMG30, mais 2 grupos controle, sendo estes o fresco em D0 (CF) e em D7 (CONT), totalizando 160 fragmentos analisados.

5.2.1. MICROSCOPIA CONFOCAL

Assim como no experimento 1, foram utilizadas as probes IP, DCF e análise de autofluorescência de NAD(P)H e FAD, para as análises de microscopia confocal.

Nas análises de viabilidade celular com uso de IP, não foram observadas diferenças de degeneração entre os tratamentos, mas houve uma diminuição (P<0,05) nos tratamentos MG10, MG20, NPMG20 e NPMG30 quando comparados ao CONT. Já o tratamento NPMG 20 apresentou menor degeneração até mesmo que o CF (P<0,05) (Tabela 8).

Tabela 8. Degeneração celular medida pela intensidade de fluorescência (pixels) emitida pelo iodeto de propídeo (I.P.) nos fragmentos de cortex ovariano bovino nos diferentes tratamentos de MG e NPMG, em D0 e D7.

I.P (Média ± EPM)		
CF = 267,75 ± 33,65		
CONT = 308,12 ± 45,85		
	MÉDIA	EPM
MG10	207,53 ^{AB#}	20,83
MG20	212,29 ^{AB#}	31,78
MG30	266,83 ^B	27,71
NPMG10	222,90 ^{AB}	47,49
NPMG20	142,89 ^{A#*}	19,21
NPMG30	188,46 ^{AB#}	19,78

^{AB} difere na coluna (P<0,05); *difere do CF (P<0,05); #difere do CONT (P<0,05)
CF = controle fresco D0 / CONT = controle D7 / EPM = erro padrão da média

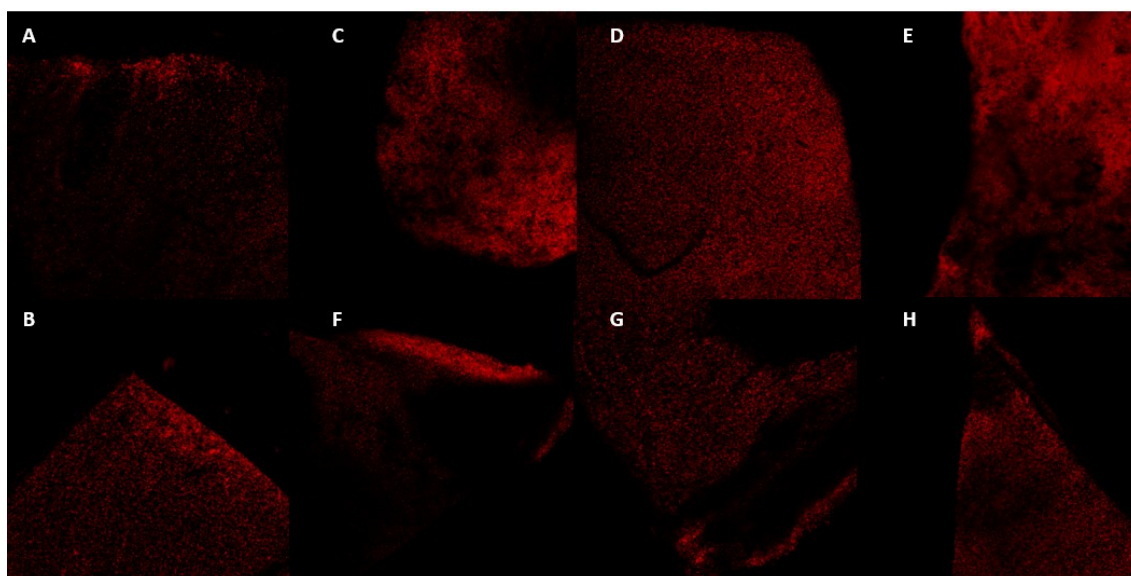


Figura 8. Intensidade de fluorescência emitida após o cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano bovino corados por IP em relação aos diferentes tratamentos (A) CF; (B) CONT; (C) MG10; (D) MG20; (E) MG30; (F) NPMG10; (G) NPMG20; (H) NPMG30.

Os resultados de emissão de espécies reativas de oxigênio (EROs) foram bem semelhantes aos resultados citados acima de IP, no qual não houveram diferenças de produção de EROs entre os tratamentos, porém os tratamentos MG10, NPMG20 e

NPMG30, apresentaram uma produção menor do que o grupo CONT ($P < 0,05$) (Tabela 9).

Tabela 9. Emissão de EROs medida pela intensidade de fluorescência (pixels) emitida pelo DCF nos fragmentos de córtex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de MG e NPMG, em D0 e D7.

DCF (Média \pm EPM)		
	MÉDIA	EPM
CF = 147,72 \pm 21,55		
CONT = 179,94 \pm 27,31		
MG10	124,11 ^{AB#}	14,23
MG20	128,76 ^{AB}	18,84
MG30	170,07 ^B	18,00
NPMG10	145,04 ^{AB}	25,46
NPMG20	94,65 ^{A#}	11,30
NPMG30	117,49 ^{AB#}	12,79

^{AB} difere na coluna ($P < 0,05$); *difere do CF ($P < 0,05$); #difere do CONT ($P < 0,05$)

CF = controle fresco D0 / CONT = controle D7 / EPM = erro padrão da média

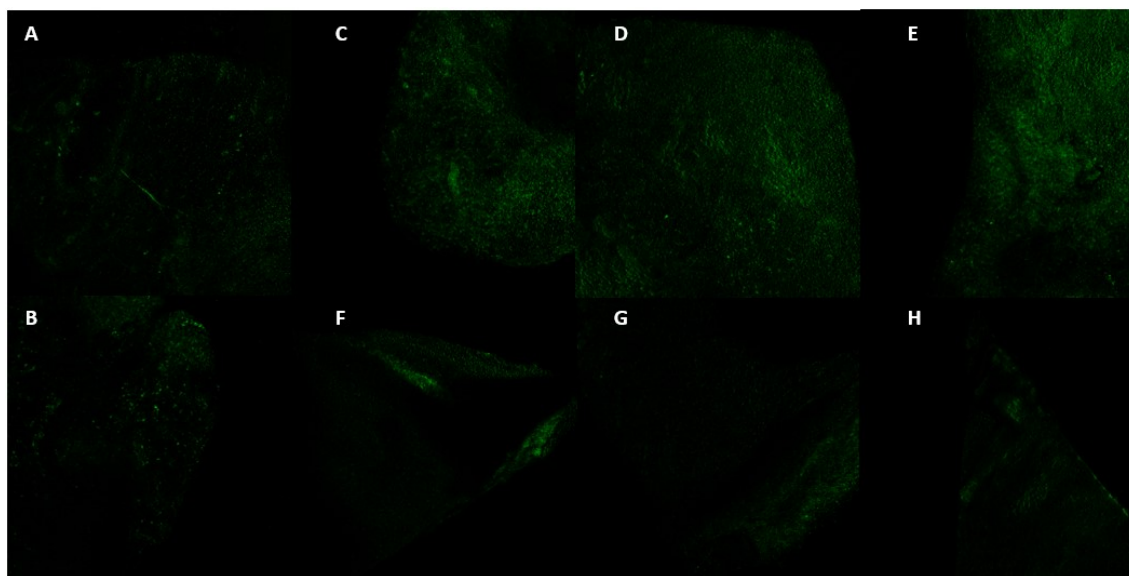


Figura 9. Intensidade de fluorescência emitida após o cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano bovino corados por DCF em relação aos diferentes tratamentos (A) CF; (B) CONT; (C) MG10; (D) MG20; (E) MG30; (F) NPMG10; (G) NPMG20; (H) NPMG30.

O estado redox mitocondrial e citoplasmático das células, foi observado pela medida de NAD(P)H e FAD. Quanto ao NAD(P)H, o tratamento NPMG20 apresentou maior expressão quando comparado ao MG20 e CF ($P < 0,05$). Além disso, o tratamento MG20 e NPMG30 também apresentaram maior emissão de NAD(P)H quando comparado ao CF ($P < 0,05$) (Tabela 10).

Tabela 10. Níveis de emissão de NADP(H) medida pela autofluorescência (pixels) nos fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de MG e NPMG, em D0 e D7.

NAD(P)H (Média \pm EPM)		
CF = 25,14 \pm 3,07		
CONT = 104,24 \pm 17,03		
	MÉDIA	EPM
MG10	51,92 ^A	4,67
MG20	79,98 ^{AB*}	10,13
MG30	78,55 ^{AB}	9,49
NPMG10	66,84 ^{AB}	7,53
NPMG20	121,33 ^{C*}	27,67
NPMG30	89,59 ^{BC*}	11,78

^{AB} difere na coluna ($P < 0,05$); *difere do CF ($P < 0,05$); #difere do CONT ($P < 0,05$)
CF = controle fresco D0 / CONT = controle D7 / EPM = erro padrão da média

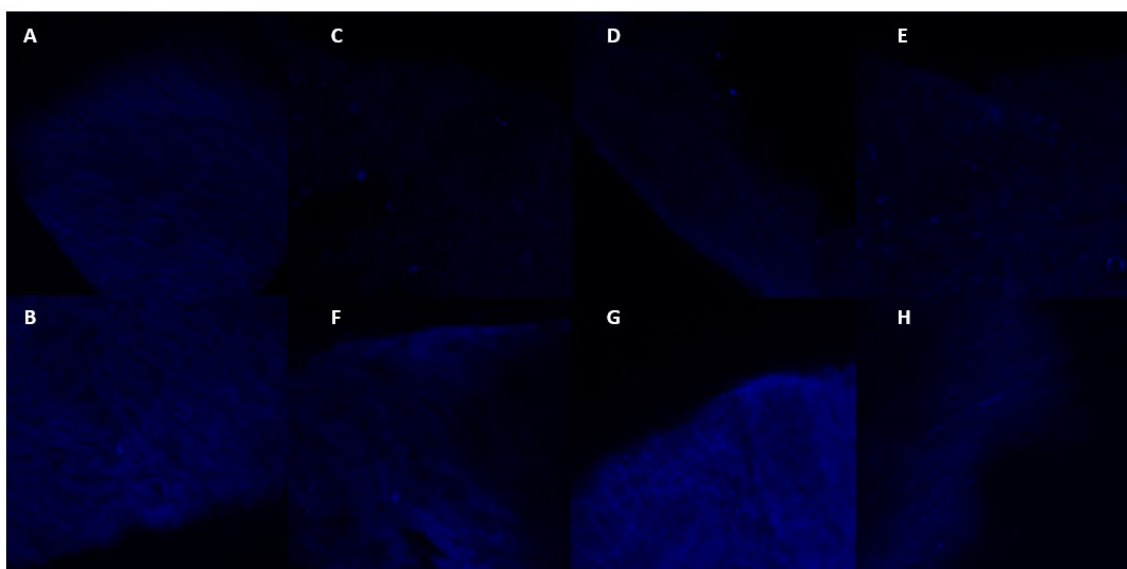


Figura 10. Intensidade de autofluorescência NAD emitida após o cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano bovino em relação aos diferentes tratamentos (A) CF; (B) CONT; (C) MG10; (D) MG20; (E) MG30; (F) NPMG10; (G) NPMG20; (H) NPMG30.

A emissão de FAD, dentro dos tratamentos de NP, o NPMG20 apresentou maior emissão quando comparado ao NPMG30 e ao CF ($P < 0,05$), não havendo maiores diferenças nesta análise (Tabela 11).

Tabela 11. Níveis de emissão de FAD medida pela autofluorescência (pixels) nos fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de MG e NPMG, em D0 e D7.

FAD (Média \pm EPM)		
CF = 24,28 \pm 1,78		
CONT = 45,37 \pm 3,60		
	MÉDIA	EPM
MG10	47,04 ^{AB}	8,91
MG20	43,01 ^{AB}	5,92
MG30	36,45 ^A	3,20
NPMG10	40,25 ^{AB}	6,81
NPMG20	52,53 ^{B*}	9,63
NPMG30	37,20 ^A	4,86

^{AB} difere na coluna ($P < 0,05$); *difere do CF ($P < 0,05$); #difere do CONT ($P < 0,05$)
CF = controle fresco D0 / CONT = controle D7 / EPM = erro padrão da média

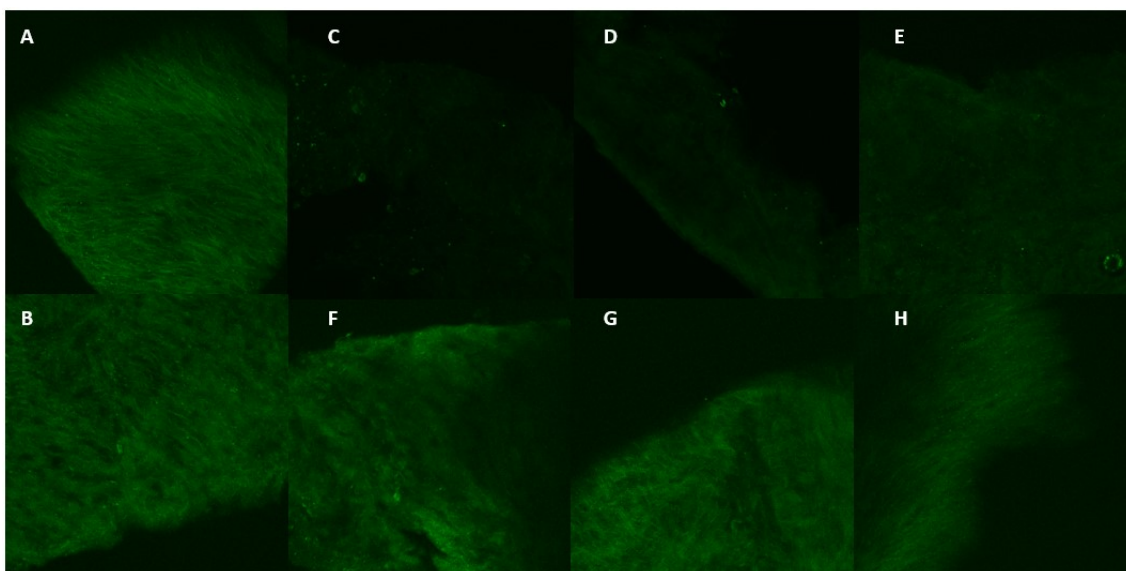


Figura 11. Intensidade de autofluorescência FAD emitida após o cultivo *in vitro* de fragmentos de córtex ovariano bovino em relação aos diferentes tratamentos (A) CF; (B) CONT; (C) MG10; (D) MG20; (E) MG30; (F) NPMG10; (G) NPMG20; (H) NPMG30.

Foi realizada também a análise de relação de autofluorescência de logFAD: NAD(P)H, e não foi observado nenhuma diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 12).

Tabela 12. Comparação entre os níveis de emissão do potencial redox logFAD: NAD(P)H medida pela autofluorescência (pixels) nos fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de MG e NPMG, em D0 e D7.

logFAD: NAD(P)H (Média ± EPM)		
CF = 1,66 ± 0,20		
CONT = 0,70 ± 0,14		
	MÉDIA	EPM
MG10	1,24	0,34
MG20	0,65	0,14
MG30	0,66	0,15
NPMG10	1,07	0,33
NPMG20	0,98	0,29
NPMG30	0,54	0,09

^{AB} difere na coluna (P<0,05); *difere do CF (P<0,05); #difere do CONT (P<0,05)

CF = controle fresco D0 / CONT = controle D7 / EPM = erro padrão da média

5.2.2. HISTOLOGIA

Foram analisadas 240 secções histológicas com um total de 1.912 folículos inclusos em 32 amostras de fragmentos de córtex ovariano de bovinos.

Na tabela 13 está descrito a proporção de folículos viáveis dos tratamentos propostos após 7 dias de cultivo *in vitro* comparando com o CF em D0 e CONT em D7. Ao observar estes dados, podemos perceber que as três concentrações de MG, apresentaram menor taxa de folículos viáveis, quando comparado ao CF ($P < 0,05$). Já ao observar as 3 concentrações de NP, pode-se concluir que a maior concentração prejudicou o desenvolvimento, com menor taxa de folículos viáveis. Ao comparar os tratamentos MG 10 e 20 com suas respectivas concentrações de NP, percebe-se que os grupos de NP apresentaram maior viabilidade, assemelhando ao CF ($P < 0,05$).

Tabela 13. Proporção (Média \pm EPM) de folículos viáveis em fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de MG e NPMG, em D0 e D7.

Viabilidade Geral % (Média \pm EPM)		
	MÉDIA	EPM
CF	84,22 ^A	4,37
CONT	71,32 ^{BC}	2,81
MG10	70,66 ^B	3,51
MG20	70,10 ^B	5,16
MG30	72,79 ^{BCD}	3,76
NPMG10	82,81 ^{AD}	2,55
NPMG20	81,96 ^{ACD}	2,45
NPMG30	70,90 ^B	2,66

^{AB} difere na coluna ($P < 0,05$)

CF = controle fresco D0 / CONT = controle D7 / EPM = erro padrão da média

Houve uma alta taxa de ativação folicular, com maior taxa nos tratamentos em geral, quando comparados ao CF ($P < 0,05$) (Tabela 14).

Tabela 14. Proporção (Média \pm EPM) de folículos ativados em fragmentos de cortex ovariano bovino para os diferentes tratamentos de MG e NPMG, em D0 e D7.

Ativação Folicular % (Média \pm EPM)		
	MÉDIA	EPM
CF	74,68 ^A	4,45
CONT	97,86 ^B	1,23
MG10	97,41 ^B	0,98
MG20	100,00 ^B	0,00
MG30	99,19 ^B	0,57
NPMG10	99,72 ^B	0,28
NPMG20	98,69 ^B	0,76
NPMG30	98,89 ^B	0,77

^{AB} difere na coluna (P<0,05)

CF = controle fresco D0 / CONT = controle D7 / EPM = erro padrão da média

6. DISCUSSÃO

De acordo com as pesquisas bibliográficas realizadas, este estudo foi o primeiro a testar nanopartículas de óxido de zinco dopadas com cálcio e magnésio no cultivo *in vitro* de fragmentos do córtex ovariano bovino. Com isso, a hipótese traçada foi de que as NP poderiam auxiliar na disponibilização desses íons essenciais ao desenvolvimento folicular e ovocitário, tornando sua absorção e metabolismo mais eficiente, uma vez que o tecido não se encontra em ambiente propício ao seu desenvolvimento e se torna necessária a suplementação do meio ou alteração no método de cultivo para que o ambiente *in vitro* consiga se aproximar mais do ambiente *in vivo* e assim atingir bons resultados na ativação, desenvolvimento folicular e conseqüentemente, produção de ovócitos competentes.

6.1. EXPERIMENTO 1

Nesse experimento foi testado o efeito da suplementação do meio de cultivo com NP de ZnO:0,5Ca comparada ao efeito do CaCl₂, em 3 concentrações distintas. Para isso foi analisada a degeneração celular com uso do marcador IP, o metabolismo respiratório das células teciduais pela emissão de NAD, FAD e estado redox, além de produção de EROs. Além disso também foi avaliado o efeito da suplementação na ativação e viabilidade folicular.

Inicialmente percebe-se que a NPCA na concentração de 20 µg/mL, prejudicou o cultivo do tecido, pois interferiu na manutenção da integridade da membrana celular facilitando a entrada do marcador IP, aumentando a taxa de degeneração celular que pode ter sido causado por um estresse no tecido devido a maior produção de EROs, quando comparado ao CF e seu respectivo tratamento de CA. Os íons Ca^{2+} também estão envolvidos em vias relacionadas com a morte celular quando a homeostasia desses íons é alterada, assim as células podem iniciar as cascatas de necrose e apoptose (WOJCIK-PIOTROWICZ et al., 2016). A mesma concentração de CaCl_2 não resultou no mesmo efeito, provavelmente devido ao tamanho das NP proporcionar uma maior superfície de contato das substâncias com as células, com maior biodisponibilidade e capacidade de absorção (SILVA et al., 2017b), podendo assim ter ocorrido um grande acúmulo desses íons não fornecendo a homeostase necessária, ativando as cascatas de apoptose. Além de que essa concentração de NP de ZnO pode ter sido tóxica ao tecido (SOUZA et al., 2020; SANTACRUZ-M´ARQUEZ et al., 2020).

Em paralelo a esses resultados, o NPCA20 também apresentou menor emissão de NAD(P)H e FAD quando comparado ao seu respectivo tratamento de CA, demonstrando indícios de desequilíbrio metabólico e estresse oxidativo, causando danos celulares como a degeneração identificada pelo IP e uma menor taxa de ativação folicular quando comparado ao CA20. Esse excesso de Ca^{2+} nas mitocôndrias, gera despolarização do potencial mitocondrial com maior produção de EROs levando a apoptose celular (XIA et al., 2008; IVANOVA et al., 2017; ANDO; HIROSE; MIKOSHIBA, 2018), prejudicando a ativação folicular.

As mitocôndrias são organelas de extrema importância ao metabolismo celular, produção de ATP, geração de EROs, regulação das concentrações intracelulares de Ca^{2+} e apoptose (GARCÍA-ROCHE et al., 2018; NUKALA et al., 2006). Diversas reações químicas ocorrem no interior das mitocôndrias, como o ciclo de Krebs, que tem como função oxidar acetil-CoA produzindo NADH^+ e FADH_2 , para gerar ATP mitocondrial (SANTOS, 2018), importante para todo metabolismo celular, gerando EROs, que até certo ponto são necessários a fisiologia celular, na fagocitose, sinalização intercelular, regulação do crescimento celular e síntese de substâncias importantes. Porém, seu excesso se torna prejudicial, causando lipoperoxidação de membranas, afetando sua integridade e oxidação de proteínas. Com isso infere-se que uma disfunção metabólica pode gerar diversos prejuízos celulares.

Por outro lado o tratamento CA na concentração de 20 µg/mL apresentou bons

resultados relacionados com funcionamento adequado das células, com maior emissão de NAD(P)H e FAD indicando maior atividade metabólica celular, porém com menor estresse oxidativo das células, levando a menor degeneração tecidual, demonstrando que o meio utilizado foi propício ao desenvolvimento. Demonstrando assim, que o processo de dopagem não auxiliou na disponibilidade do Ca^{2+} para as células e não reduziu uma possível citotoxicidade das NP de ZnO. Segundo Souza et al. (2020), ao testar diferentes percentuais de dopagem de NP de ZnO com Ca^{2+} , os maiores percentuais induziram maior citotoxicidade. Isso porque o processo de dopagem, proporciona alteração de propriedades físicas que podem proporcionar entrada mais eficiente das NP nas células, causando maior interação com proteínas e biomoléculas relacionadas à produção de EROs e apoptose celular (Das et al. 2018).

Esses resultados obtidos neste experimento, foram semelhantes aos citados por outros trabalhos que utilizaram a NP de ZnO pura, os quais realtam que esta NP é responsável por gerar alterações mitocondriais, com aumento dos níveis de EROs, tornando o pH do citoplasma ácido, prejudicando os lisossomos, levando a autofagia e morte celular (TURRENS, 2003; MURPHY, 2009; VANDEBRIEL, DE JONG, 2012; SAPTARSHI, DUSCHL, LOPATA, 2015; JOHNSON, 2015). Segundo Santacruz-M´arquez et al. (2020), o uso das NP de ZnO puro nas concentrações de 5, 15 e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em cultivo de folículos ovarianos antrais de camundongos, apresentou toxicidade com aumento da produção de EROs e causou danos ao citoesqueleto do folículo, prejudicando as junções intercomunicantes entre oócito e células do cumulus.

Também foi detectado que as maiores concentrações de CaCl_2 apresentaram menor emissão de EROs, assim como a maior concentração da NP. Esse resultado vai de encontro com o resultado histológico, no qual apenas os tratamentos CA30 e NPCA30, apresentaram uma viabilidade folicular semelhante ao CF, o restante dos tratamentos resultaram em queda na viabilidade. Porém esse resultado da NP de maior concentração, não foi esperado, uma vez que todos os outros resultados citados acima, não vão ao encontro com essa realidade. Uma hipótese para isso, é que a própria célula pode ter ativado mecanismos de bloqueio a permeabilidade da NP a partir do momento em que foi atingida a homeostase, causando assim menor dano nas junções comunicantes celulares e organelas mitocondriais, demonstrado também pela menor emissão de EROs no tratamento NPCA30, utilizando assim apenas o necessário para um bom desenvolvimento.

6.2. EXPERIMENTO 2

No segundo experimento foi testado o efeito da suplementação do meio de cultivo com NP de ZnO:0,5Mg comparada ao efeito do MgCl₂, em 3 concentrações distintas. Para isso foram realizadas as mesmas análises citadas no experimento 1, como degeneração tecidual, metabolismo respiratório das células teciduais e ativação e viabilidade folicular.

O tratamento NPMG20 resultou em menor taxa de degeneração celular quando comparado com os controles e maior concentração de MgCl₂, auxiliando na manutenção da integridade da membrana, dificultando a entrada do marcador IP, diminuindo a taxa de degeneração celular. Conforme a concentração de MgCl₂ aumentou, observou-se maior degeneração celular, ao contrário das NP que apresentaram menor degeneração nas maiores concentrações, comparada ao CONT. Esses resultados podem ser explicados com os resultados de produção de EROs, no qual as menores concentrações de MgCl₂ e as maiores concentrações das NP tiveram menor produção de EROs, comparadas ao CONT. Isso porque a maior produção de EROs está relacionada a um estresse celular que prejudica os componentes celulares, podendo levar a degeneração. Com isso percebe-se que o processo de dopagem com a NP de ZnO, foi benéfico ao tecido, uma vez que esse processo causa alterações de propriedades físicas, o que pode fazer com que haja entrada mais eficiente das NP nas células, e com isso maior biodisponibilidade (SILVA et al., 2017b), inclusive do íon Zn²⁺, que para estimular o desenvolvimento folicular precisa estar em alta concentração, pois sabe-se que sua falta pode levar à apoptose celular (CHEN et al., 2023), neste caso, esse tratamento proporcionou o equilíbrio no ambiente intracitoplasmático tecidual.

Além disso o tratamento NPMG20 apresentou uma maior produção de NAD comparado a sua respectiva concentração de MgCl₂ e CF e maiores níveis de FAD comparado a CF. Isso relacionado a baixa emissão de EROs demonstra que as células nesse tratamento desempenharam atividade metabólica eficiente, e as substâncias presentes no meio de cultivo, inclusive os antioxidantes como a Glutamina, foram eficientes no controle da produção de EROs, mantendo ambiente propício ao desenvolvimento celular, demonstrado pelo resultado de viabilidade folicular, pois o tratamento NPMG20 foi um dos únicos a apresentar viabilidade semelhante ao CF, assim como o NPMG10, diferente do restante dos tratamentos que tiveram sua viabilidade reduzida. Esses resultados corroboram com os dados da literatura, que reportam que o Mg²⁺ interfere no metabolismo celular, gerando manutenção do estado antioxidante da

célula, regulação no ciclo celular e apoptose (WOLF; CITTADINI, 1999). Segundo Iwata et al. (2005), o aumento na concentração de Mg^{2+} no fluido folicular, melhora o desenvolvimento folicular e oocitário.

Pode-se inferir que a concentração testada de $MgCl_2$ não foi eficiente em proporcionar os benefícios reportados na literatura sobre a homeostase deste íon. Porém com a dopagem com a NP de ZnO, provavelmente houve uma potencialização da ação do Mg^{2+} nas células teciduais. Dessa forma o processo de dopagem com alterações de propriedades físicas foi capaz de reduzir a toxicidade das NP de ZnO puras, não havendo sinais de prejuízos mitocondriais e nem nas junções celulares comunicantes.

Esses resultados foram contra alguns resultados encontrados na literatura como os citados por Saber et al. (2021) que testaram o efeito da NP de ZnO pura nas concentrações de 10, 20 e 30 $\mu g/mL$ em cultivo de células germinativas ovarianas de camundongos durante 7 dias e detectaram efeito citotóxico de maneira dependente do tempo e da concentração. Além disso, Santacruz-M´arquez et al. (2020), também apresentaram resultados de toxicidade com o uso das NP de ZnO puras nas concentrações de 5, 15 e 25 $\mu g/mL$ em cultivo de foliculos ovarianos antrais de camundongos.

CONCLUSÕES

Com os resultados do experimento 1 conclui-se que a NP de ZnO:0,5Ca na concentração de 20 $\mu g/mL$ prejudica o desenvolvimento celular e folicular quando comparado aos efeitos do tratamento de $CaCl_2$ na mesma concentração, demonstrando assim que essa formulação apresenta efeitos citotóxicos no cultivo de fragmentos do córtex ovariano bovino, sendo necessárias mais pesquisas para entender os mecanismos dessa toxicidade.

Já como os resultados do experimento 2 conclui-se que o processo de dopagem alterou de forma eficiente as propriedades físicas da NP ZnO:0,5Mg, uma vez que esta apresentou bons resultados, otimizando os efeitos do Mg^{2+} , proporcionando ambiente favorável ao desenvolvimento celular e folicular, com o uso da concentração de 20 $\mu g/mL$ quando comparado aos efeitos do respectivo tratamento de $MgCl_2$ na mesma concentração e ao grupo controle aos 7 dias de cultivo de fragmentos do córtex ovariano bovino. Este resultado se torna importante, uma vez que as NP de ZnO estão sendo utilizadas em grande escala em embalagens de alimentícias e sua toxicidade está sendo observada em alguns trabalhos, podendo este quadro ser revertido com o processo de dopagem e a

combinação correta dos íons.

REFERÊNCIAS

ABIR R., NITKE S., BEM-HAROUSH A., FISCH B. In vitro maturation of human primordial ovarian follicles: clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. *Histol Histopathol*, v.26,p.887-898, 2006.

ADELEYE A. S., POKHREL S., MÄDLER L., KELLER A. A. Influence of nanoparticle doping on the colloidal stability and toxicity of copper oxide nanoparticles in synthetic and natural waters. *Water Res.*, v.132, p.12-22, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.069>

ALVES K. A., ALVES B. G., ROCHA C. D., VISONNÁ M., MOHALLEM R. F., GASTAL M. O., et al. Number and density of equine preantral follicles in different ovarian histological section thicknesses. *Theriogenology*, v.83, p.1048-55, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.004>

AN L., MARJANI S. L., WANG Z., LIU Z., LIU R., XUE F., ... DU F. Magnesium is a critical element for competent development of bovine embryos. *Theriogenology*, v.140, p.109-116, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.08.015>

ANDO H., HIROSE M., MIKOSHIBA, K. Aberrant IP3 receptor activities revealed by comprehensive analysis of pathological mutations causing spinocerebellar ataxia 29. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.115, p.12259-12264, 2018.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1811129115>

ARAÚJO V. R., ALMEIDA A. P., MAGALHÃES D. M., MATOS M. H. T., TAVARES L. M. T., FIGUEIREDO J. R., RODRIGUES A. P. R. Papel das Proteínas Morfogenéticas Ósseas-6 e -7 (BMP-6 e -7) na regulação da foliculogênese inicial em mamíferos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.34, p.69-78, 2010.

ARAÚJO V. R., GASTAL M. O., FIGUEIREDO J. R., GASTAL E. L. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. *Reprod Biol Endocrinol*, v.12, n.78, p.1-14, 2014.

<https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-78>

BAE S. Y., NA C. W., KANG J. H., PARK J. Comparative structure and optical properties of Ga-, In-, and Sn-doped ZnO nanowires synthesized via thermal evaporation. *J Phys Chem B.*, v.109, n.7, p.2526-31, 2005.

<https://doi.org/10.1021/jp0458708>

BELLE R., MULNER-LORILLON O., MAROT J., OZON R. A possible role for Mg²⁺ ions in the induction of meiotic maturation of *Xenopus* oocyte. *Cell*

Differentiation, v.19, p.253-261, 1986.

[https://doi.org/10.1016/0045-6039\(86\)90102-8](https://doi.org/10.1016/0045-6039(86)90102-8)

BERNABÉ B. P., WOODRUFF T., BROADBELT L. J., SHEA L. D. Ligands, Receptors, and Transcription Factors that Mediate Inter-Cellular and Intra-Cellular Communication during Ovarian Follicle Development. *Reprod Sci*, v.27, n.2, p.690-703, 2020.

<https://doi.org/10.1007/s43032-019-00075-8>

BERNHARDT M. L., KONG B. Y., KIM A. M., O'HALLORAN T. V., WOODRUFF T. K. A zinc-dependent mechanism regulates meiotic progression in mammalian oocytes. *Biology of reproduction*, v.86, n.4, p.114, 1-10, 2012.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.097253>

BOLAND M. P. Efecto de los minerales traza en aspectos productivos em bovinos. XXXI Jornadas Uruguayas de Buiatría, 2003.

BRAW-TAL R., YOSSEFI S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Reprod Fertil Develop*, v.109, p.165-171, 1997.

<https://doi.org/10.1530/jrf.0.1090165>

CASARINI L., CRÉPIEUX P. Molecular Mechanisms of Action of FSH. *Front. Endocrinol*, v.10, p.305, 2019.

<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00305>

CHEN YU-YING., CHEN S., OK K., DUNCAN F. E., O'HALLORAN T. V., WOODRUFF T. K. Zinc dynamics regulate early ovarian follicle development. *Journal of Biological Chemistry*, v.299, n.1, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102731>

CLAPHAM D.E. Calcium Signaling. *Cell*, v.131, p.1047-1058, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>

COLLADO-FERNANDEZ E., PICTON H. M., DUMOLLARD R. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *Int J Dev Biol*, v.56, n.10-12, p.799-808, 2012.

<https://doi.org/10.1387/ijdb.120140ec>

DALBIES-TRAN R., CADORET V., DESMARCHAIS A., ELIS S., MAILLARD V., MONGET P., MONNIAUX D., REYNAUD K., SAINT-DIZIER M., UZBEKOVA S. A. Comparative Analysis of Oocyte Development in Mammals. *Cells*, v.9, n.4, p.1002-1029, 2020.

<https://doi.org/10.3390/cells9041002>

DAYEM A. A., HOSSAIN M. K., LEE S. B., KIM K., SAHA S. K., YANG G. M., CHOI H. Y., CHO S. G. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.*, v.18, p.120, 2017.

<https://doi.org/10.3390/ijms18010120>

DAS B. K., VERMA S. K., DAS T. et al. Altered electrical properties with controlled copper doping in ZnO nanoparticles infers their cytotoxicity in macrophages by ROS induction and apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, v.297, p.141-54, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.11.004>

DE SÁ, N. A. R. et al. First pregnancy after in vitro culture of early antral follicles in goats: Positive effects of anethole on follicle development and steroidogenesis. *Molecular Reproduction and Development*, v. 87, p. 1-12, 2020.
<https://doi.org/10.1002/mrd.23410>

DE SOUZA G. L., MOURA C. C. G., SILVA A. C. A., MARINHO J. Z., SILVA T. R., DANTAS N. O.,... TURRIONI, A. P. Effects of zinc oxide and calcium-doped zinc oxide nanocrystals on cytotoxicity and reactive oxygen species production in different cell culture models. *Restorative Dentistry & Endodontics*, v. 45, n. 4, 2020.
<https://doi.org/10.5395/rde.2020.45.e54>

DICKENS B. F., WEGLIICKI W. B., LI Y. S., MAK, I. T. Magnesium deficiency in vitro enhances free radical-induced intracellular oxidation and cytotoxicity in endothelial cells. *FEBS letters*, v.311, n.3, p.187-191, 1992.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)81098-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)81098-7)

DRYDEN M. Reactive oxygen therapy: A novel antimicrobial. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.51, n.3, p.299-303, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.08.029>

DUDEV T., LIM C. Principles governing Mg, Ca, and Zn binding and selectivity in proteins. *Chemical reviews*, v. 103, n. 3, p. 773-788, 2003.
<https://doi.org/10.1021/cr020467n>

FABRI R., VICENTI R., MARTINO N. A., DELL'AQUILA M. E., PASQUINELLI G., MACCIOCCA M., MAGNANI V., PARADISI R., VENTUROLI, S. Confocal laser scanning microscopy analysis of bioenergetic potential and oxidative stress in fresh and frozen- thawed human ovarian tissue from oncologic patients. *Fertility and Sterility*, v.101, n.3, p. 795-804, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.11.032>

FERREIRA, A. M. Reprodução da fêmea bovina: fisiologia aplicada e problemas mais comuns (causas e tratamentos). 1ed. Juiz de Fora: Editar, 2010.

FIGUEIREDO J. R., LIMA L. F. Tecnologia do ovário artificial: aplicações, estado da arte, limitações e perspectivas. *Rev Bras Reprod Anim*, v.41, n.1, p.248-253, 2017.

FIGUEIREDO J. R., LIMA L. F., SILVA J. R. V., SANTOS R. R. Control of growth and development of preantral follicle: insights from in vitro culture. *Anim Reprod*, v.15, p. 648-659, 2018.
<https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0019>

FILATOV M. A., KHRAMOVA Y. V., KISELEVA M. V., MALINOVA I. V., KOMAROVA E. V., SEMENOVA M. L. Female fertility preservation strategies: cryopreservation and ovarian tissue in vitro culture, current state of the art and future perspectives. *Zygote*, v.24, n.5, p.1-19, 2016.
<https://doi.org/10.1017/S096719941600006X>

FLETCHER E. J., SANTACRUZ-MÁRQUEZ R., MOURIKES V. E., NEFF A. M., LAWS M. J., FLAWS J. A. Effects of Phthalate Mixtures on Ovarian Folliculogenesis and Steroidogenesis. *Toxics*, v.10, p.251, 2022
<https://doi.org/10.3390/toxics10050251>

FLORES J. A., AGUIRRE C., SHARMA O. P., VELDHUIS, J. D. Luteinizing Hormone (LH) Stimulates Both Intracellular Calcium Ion ($[Ca^{2+}]_i$) Mobilization and Transmembrane Cation Influx in Single Ovarian (Granulosa) Cells: Recruitment as a Cellular Mechanism of LH- $[Ca^{2+}]_i$ Dose Response*. *Endocrinology*, v.139, p.3606-3612, 1998.
<https://doi.org/10.1210/endo.139.8.6162>

FRAUSTO DA SILVA, J. J. R., WILLIAMS, R. J. P. *The Biological Chemistry of the Elements*. Oxford University Press: Oxford, 1991.

FUKADA, T., Kambe, T (Ed.). *Zinc signals in cellular functions and disorders*. Springer Japan, 2014.
<https://doi.org/10.1007/978-4-431-55114-0>

GARCÍA-ROCHE, M. et al. Respiratory analysis of coupled mitochondria in cryopreserved liver biopsies. *Redox Biology*, v. 17, p. 207-212, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.03.008>

GIORGI C., BALDASSARI F., BONONI A., BONORA M., DE MARCHI E., MARCHI S., MISSIROLI S., PATERGNANI S., RIMESSI A., SUSKI J. M. et al. Mitochondrial Ca^{2+} and apoptosis. *Cell Calcium*, v.52, p.36-43, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.02.008>

GONÇALVES P. B. D., FIGUEIREDO J. R., FREITAS V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Roca; 2008.

GREEN L. J., SHIKANOV A. In vitro culture methods of preantral follicles. *Theriogenology*, v.86, n.1, p.229-238, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.036>

HANNA R., DOUDNA J. A. *Curr. Opin. Chem. Biol*, v. 4, p.166, 2000.

HUANG Y. W., CAMBRE M., LEE H. J. The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms. *International journal of molecular sciences*, v.18, pii:E2702, 2017.
<https://doi.org/10.3390/ijms18122702>

IAVICOLI I., FONTANA L., LESO V., BERGAMASCHI A. The Effects of Nanomaterials as Endocrine Disruptors. *Int. J. Mol. Sci.*, v.14, p.16732-16801, 2013.
<https://doi.org/10.3390/ijms140816732>

IVANOVA H., KERKHOF M., LA ROVERE R. M., BULTYNCK G. Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Ca²⁺ Fluxes Underlying Cancer Cell Survival. *Front. Oncol.*, v.7, p.70, 2017.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00070>

IWATA H., INOUE J., KIMURA K., KUGE T., KUWAYAMA T., MONJI Y. Comparison between the characteristics of follicular fluid and the developmental competence of bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* In press., 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.04.006>

JAGIELLO G., DUCAYEN M. B., DOWNEY R., JONASSEN A. Alterations of mammalian oocyte meiosis I with divalent cations and calmodulin. *Cell Calcium*, v.3, n.2, p.153-162, 1982.
[https://doi.org/10.1016/0143-4160\(82\)90011-2](https://doi.org/10.1016/0143-4160(82)90011-2)

JOHNSON J., CANNING J., KANEKO T., PRU J. K., TILLY J. L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, v.428, p.145-150, 2004.
<https://doi.org/10.1038/nature02316>

JOHNSON B.M., FRAIETTA J.A., GRACIAS D.T., HOPE J.L., STAIRIKER C.J., PATEL P.R., MUELLER Y. M., MCHUGH M.D., JABLONOWSKI L.J., WHEATLEY M.A., KATSIKIS P.D. Acute exposure to ZnO nanoparticles induces autophagic immune cell death. *Nanotoxicology*. v.9, n.6, p.737-748, 2015.
<https://doi.org/10.3109/17435390.2014.974709>

KARLSTAD J., SUN Y., SINGH B.B. Ca²⁺ Signaling: An Outlook on the Characterization of Ca²⁺ Channels and Their Importance in Cellular Functions. *Calcium Signaling* p.143-157, 2012.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_6

KIDDER G. M., MHAWI A. A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*, v. 123, n. 5, p. 613-620, 2002.
<https://doi.org/10.1530/rep.0.1230613>

KIM A. M., VOGT S., O'HALLORAN T. V., WOODRUFF T. K. Zinc availability regulates exit from meiosis in maturing mammalian oocytes. *Nat. Chem. Biol.* v. 6, n. 9, p. 674-681, 2010.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.419>

KIM A. M., BERNHARDT M. L., KONG B. Y., AHN R. W., VOGT S., WOODRUFF T. K., O'HALLORAN T. V. Zinc sparks are triggered by fertilization and facilitate cell cycle resumption in mammalian eggs. *ACS Chem. Biol.* v. 6, n. 7, p.

716-723, 2011.

<https://doi.org/10.1021/cb200084y>

KONG B. Y., DUNCAN F. E., QUE E. L., XU Y., VOGT S., O'HALLORAN T. V., WOODRUFF T. K. The inorganic anatomy of the mammalian preimplantation embryo and the requirement of zinc during the first mitotic divisions. *Dev. Dyn.* v. 244, n. 8, p. 935-947, 2015.

<https://doi.org/10.1002/dvdy.24285>

KOR, N. M., KHANGHAH, K. M., VEISI, A. Follicular fluid concentrations of biochemical metabolites and trace minerals in relation to ovarian follicle size in dairy cows. *Annu. Res. Rev. in Biol.* p. 397-404, 2013.

LANDSIEDEL R., FABIAN E., MA-HOCK L., WOHLLEBEN W., WIENCH K., OESCH F., VAN RAVENZWAAY B. Toxicokinetics of nanomaterials. *Arch. Toxicol.* v. 86, p. 1021-1060, 2012.

<https://doi.org/10.1007/s00204-012-0858-7>

LANE M., BOATMAN D. E., ALBRECHT R. M., BAVISTER B. D. Intracellular divalent cation homeostasis and developmental competence in the hamster preimplantation embryo. *Mol. Reprod. Dev.* v. 50, n. 4, p. 443-450, 1998.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199808\)50:4<443::AID-MRD8>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199808)50:4<443::AID-MRD8>3.0.CO;2-I)

LEIBFRIED L., FIRST N. L. Effects of divalent cations on in vitro maturation of bovine oocytes. *J. Exp. Zool.* v.210, p.575-580, 1979.

<https://doi.org/10.1002/jez.1402100322>

LIANG S. L., ZHAO Q. J., LI X. C., JIN Y. P., WANG Y. P., SU X. H., GUAN W. J., MA, Y. H. Dynamic analysis of Ca²⁺ level during bovine oocytes maturation and early embryonic development. *J. Vet. Sci.* v. 12, n. 2, p. 133-142, 2011.

<https://doi.org/10.4142/jvs.2011.12.2.133>

LIPPARD S. J., BERG J. M. Principles of Bioinorganic Chemistry; University Science Books: Mill Valley, California, 1994.

LO M. N., DAMON L. J., WEI TAY J., JIA S., PALMER A. E. Single cell analysis reveals multiple requirements for zinc in the mammalian cell cycle. *Elife*, v. 9, p. e51107, 2020.

<https://doi.org/10.7554/eLife.51107>

MARTIN H., RICHERT L., BERTHELOT A. Magnesium deficiency induces apoptosis in primary cultures of rat hepatocytes. *J. Nutr.* v. 133, n. 8, p. 2505-2511, 2003.

<https://doi.org/10.1093/jn/133.8.2505>

MASTROTOTARO L., SMORODCHENKO A., ASCHENBACH J. R., KOLISEK M., SPONDER G. Solute carrier 41A3 encodes for a mitochondrial Mg(2+) efflux

system. *Sci Rep*, v. 6, n. 1, p. 27999, 2016.

<https://doi.org/10.1038/srep27999>

MCLAUGHLIN M., ALBERTINI D. F., WALLACE W. H. B., ANDERSON R. A., TELFER, E. E. Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multi-step culture system. *Mol. Hum. Reprod.* v. 24, n. 3, p. 135-142, 2018.

<https://doi.org/10.1093/molehr/gay002>

MCNATTY K. P., HEATH D. A., LUNDY T., FIDLER A. E., QUIRKE L., O'CONNELL A., SMITH P., GROOME N., TISDALL, D. J. Control of early ovarian follicular development. *J. Reprod. Fertil.* p. 3-16, 1999.

MELLO R. R. C., FERREIRA, J. E., SOUSA, S. L. G., MELLO, M. R. B., PALHANO, H. B. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* v.40, n.2, p.58-64, 2016.

MI G., SHI D., WANG M., WEBSTER T. J. Reducing bacterial infections and biofilm formation using nanoparticles and nanostructured antibacterial surfaces. *Adv. Healthc. Mater.*, v. 7, n. 13, p. 1-23, 2018.

<https://doi.org/10.1002/adhm.201800103>

MODY V. V., SIWALE R., SINGH A., MODY H. R. Introduction to metallic nanoparticles. *J. Pharm. Bioallied Sci.* v. 2, n. 4, p. 282, 2010.

<https://doi.org/10.4103/0975-7406.72127>

MONNIAUX D. Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. *Theriogenology*, v. 86, n. 1, p. 41-53, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.017>

MONIRUZZAMAN M., MIYANO T. Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals. *J. Reprod. Dev.* v. 56, n. 6, p. 559-566, 2010.

<https://doi.org/10.1262/jrd.10-071H>

MOORE K. L., PERSAUD T. V. N. *Embriologia Basica*. Rio de Janeiro: Elsevier. 2008.

MURPHY M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem. J.* v. 417, n. 1, p. 1-13, 2009.

<https://doi.org/10.1042/BJ20081386>

NEHER E., SAKABA T. Multiple Roles of Calcium Ions in the Regulation of Neurotransmitter Release. *Neuron.* v. 59, n. 6, p. 861-872, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.08.019>

NUKALA V. N., SINGH I. N., DAVIS L. M., SULLIVAN P. G. Cryopreservation of brain mitochondria: A novel methodology for functional studies. *J. Neurosci. Methods.*

v. 152, n. 1-2, p. 48-54, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.08.017>

O'BRIEN M. J., PENDOLA J. K., EPPIG J. J. A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol. Reprod.* v.68, p.1682-1686, 2003.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.013029>

PAES V. M., VIEIRA L. A., CORREIA H. H. V., SA N. A. R., MOURA A. A. A., SALES A. D., RODRIGUES A. P. R., MAGALHÃES-PADILHA D. M., SANTOS F. W., APGAR G. A., CAMPELLO C. C., CAMARGO L. S. A., FIGUEIREDO J. R. Effect of heat stress on the survival and development of in vitro cultured bovine preantral follicles and on in vitro maturation of cumulus- oocyte complex. *Theriogenology*, v.86, p.994-1003, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.027>

PATI R., MEHTA R. K., MOHANTY S., PADHI A., SENGUPTA M., VASEEHARAN B., GOSWAMI C., SONAWANE A. Topical application of zinc oxide nanoparticles reduces bacterial skin infection in mice and exhibits antibacterial activity by inducing oxidative stress response and cell membrane disintegration in macrophages. *Nanomedicine.* v. 10, n. 6, p. 1195-1208, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.02.012>

PAYER A. F. Permeability of ovarian follicles and capillaries in mice. *Am. J. Anat.*, v. 142, n. 3, p. 295-317, 1975

<https://doi.org/10.1002/aja.1001420303>

PEREIRA M., MILLOT J. M., SEBILLE S., MANFAIT M. Inhibitory effects of extracellular Mg²⁺ on intracellular Ca²⁺ dynamic changes and thapsigargin-induced apoptosis in human cancer MCF7 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 229, v. 229, p. 163-171, 2002.

<https://doi.org/10.1023/A:1017972622312>

PETERS O. A. Research that matters - biocompatibility and cytotoxicity screening. *Int. Endod. J.* v. 46, n. 3, p. 195-7, 2013.

<https://doi.org/10.1111/iej.12047>

PILCHOVA I., KLACANOVA K., TATARKOVA Z., KAPLAN P., RACAY P. The involvement of Mg(2+) in regulation of cellular and mitochondrial functions. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, p. 6797460, 2017 (2017).

<https://doi.org/10.1155/2017/6797460>

PREMANATHAN M., KARTHIKEYAN K., JEYASUBRAMANIAN K., MANIVANNAN G. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. *Nanomedicine.* v. 7, n. 2, p. 184-192, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.10.001>

PUSPASARI V., RIDHOVA A., HERMAWAN A., AMAL M. I., KHAN M. M. ZnO-based antimicrobial coatings for biomedical applications. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* v. 45, n. 9, p. 1421-1445, 2022.

<https://doi.org/10.1007/s00449-022-02733-9>

QUE E. L., DUNCAN F. E., BAYER A. R., PHILIPS S. J., ROTH E. W., BLEHER R., GLEBER S. C., VOGT S., WOODRUFF T. K., THOMAS V., O'HALLORAN T. V. Zinc sparks induce physiochemical changes in the egg zona pellucida that prevent polyspermy. *Int. J. Integr. Biol.*, v. 9, n. 2, p. 135-144, 2017.

<https://doi.org/10.1039/C6IB00212A>

SABER M., HAYAEI-TEHRANI R. S., MOKHTARI S., HOORZAD P., ESFANDIARI F. In vitro cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles in mouse ovarian germ cells. *Toxicol. Vitro.* v. 70, p. 105032, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.105032>

SAMROT A.V., PRAKASH L. X. N. R. Nanoparticles Induced Oxidative Damage in Reproductive System and Role of Antioxidants on the Induced Toxicity. *Life.* v. 13, n. 3, p. 767, 2023.

<https://doi.org/10.3390/life13030767>

SANTOS A. L. P.. Função mitocondrial em camundongos e pacientes com defeitos em componentes da biologia dos telômeros. Ribeirão Preto - SP: [s. n.], 2018.

SANTACRUZ M. R., SOLORIO R. A., GONZÁLEZ P. S., GARCÍA Z. S. P., SANTOYO S. J., DE VIZCAYA R. A., HERNÁNDEZ O. I. Comparative effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles on growth and ultrastructure of ovarian antral follicles. *Reprod. Toxicol.* v. 96, p. 399-412, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.08.003>

SANTACRUZ M. R., SANTOS M. G. D. L., HERNÁNDEZ O. I. Ovarian toxicity of nanoparticles. *Reprod. Toxicol.* v. 103, p. 79-95, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2021.06.002>

SAPTARSHI S. R., DUSCHL A., LOPATA A. L. Biological reactivity of zinc oxide nanoparticles with mammalian test systems: an overview, *Nanomedicine.* v. 10, n. 13, p. 2075-2092, 2015.

<https://doi.org/10.2217/nmm.15.44>

SAWAI J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. *J. Microbiol.* v. 54, n. 2, p. 177-182, 2003.

[https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00037-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00037-X)

SCHÄDLICH A., HOFFMANN S., MUELLER T., CAYSA H., ROSE C., GÖPFERICH A., LI J., KUNTSCHKE J., MÄDER K. Accumulation of nanocarriers in the ovary: A neglected toxicity risk? *J. Control. Release.* v. 160, n. 1, p. 105-112, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.02.012>

SCHMITZ C., DEASON F., PERRAUD A. L. Molecular components of vertebrate Mg²⁺-homeostasis regulation. *Magnes Res.* v. 20, n. 1, p. 6-18, 2007.

SELSTAM G., ROSBERG S., LILJEKVIST J., GRÖNQVIST L., PERKLEV T., AHRÉN K. Differences in action of LH and FSH on the formation of cyclic amp in the prepubertal rat ovary. *Eur. J. Endocrinol.* v. 81, n. 1, p. 150-164, 1976.
<https://doi.org/10.1530/acta.0.0810150>

SENEDA M. M., BERGAMO L. Z., MIGUEZ-GONZÁLEZ S., ZANGIROLAMO A. F., MOROTTI F. Oogênese e Foliculogênese em bovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v. 45, n. 4, p. 323-328, 2021.
<https://doi.org/10.21451/1809-3000.RBRA2021.042>

SILVA A. W. B., RIBEIRO R. P., MENEZES V. G., BARBERINO R. S., PASSOS J. R. S., DAU A. M. P., COSTA J. J. N., MELO L. R. F., BEZERRA F. T. G., DONATO M. A. M., PEIXOTO C. A., MATOS M. H. T., GONÇALVES P. B. D., VAN DEN HURK R., SILVA, J. R. V. Expression of TNF- α system members in bovine ovarian follicles and the effects of TNF- α or dexamethasone on preantral follicle survival, development and ultrastructure in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* v.182, p. 56-68, 2017. a
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.04.010>

SILVA A. C. A., DANTAS N. O., SILVA M. J. B., SPANÓ M. A., GOULART L. R. Functional nanocrystals: Towards biocompatibility, nontoxicity and biospecificity. *Advances in Biochemistry & Applications in Medicine*. 1st ed. Wilmington: Open Access eBooks, p. 1-27, 2017.

SILVA-SANTOS K. C., SANTOS G. M. G., SILOTO L. S., HERTEL M. F., ANDRADE E. R., RUBIN M. I. B., STURION L., STERZA F. A. M., SENEDA M. M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* females. *Theriogenology*, v.76, p.1051-1057, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.008>

TANKHIWALE R., BAJPAI S. K. Preparation, characterization and antibacterial applications of ZnO-nanoparticles coated polyethylene films for food packaging. *Colloids Surf B Biointerfaces.* v. 90, p. 16-20, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.031>

TELFER E. E., MCLAUGHLIN M., DING C., THONG K. J. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum. Reprod.* v. 23, n. 5, p. 1151-1158, 2008.
<https://doi.org/10.1093/humrep/den070>

THOMSON A. J., GRAY H. B. Bio-inorganic chemistry. *Curr Opin Chem Biol.* v. 2, n. 2, p. 155-158, 1998.
[https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(98\)80056-2](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(98)80056-2)

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

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>

VANDEBRIEL R., DE JONG W. A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. *Nanotechnol Sci Appl.* p. 61-71, 2012.

<https://doi.org/10.2147/NSA.S23932>

VAN DEN HURK R., ABIR R., TELFER E. E., BEVERS M. M. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Hum Reprod Update* v. 6, n. 5, p. 457-474, 2000.

<https://doi.org/10.1093/humupd/6.5.457>

VAN DEN HURK R., ZHAO J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenol* v. 63, n. 6, p. 1717-1751, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.005>

VERGARA H. D. C., ARAUZ R. A. E. E., FUENTES P. A., PIMENTEL J. K. G., CEDEÑO J. G., ARCELINO C. P. S. C. Reproductive and productive performance of brown and swiss cows in semi-intensive production system in humid tropical environment. *Scientific Journal of Animal Production*, 2018.

WALKER B.N., BIASE F.H. The blueprint of RNA storages relative to oocyte developmental competence in cattle (*Bos taurus*). *Biol Reprod*, v.102, n.4, p.784-794, 2020.

<https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa015>

WARHEIT D. B. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? *Toxicol Sci.* v. 101, n. 2, p. 183-185, 2008.

<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm279>

WISE T. Biochemical analysis of bovine follicular fluid: albumin, total protein, lysosomal enzymes, ions, steroids and ascorbic acid content in relation to follicular size, rank, atresia classification and day of estrous cycle. *J Anim Sci.* v. 64, n. 4, p. 1153-1169, 1987.

<https://doi.org/10.2527/jas1987.6441153x>

WÓJCIK-PIOTROWICZ K., KASZUBA-ZWOIŃSKA J., ROKITA E., THOR P. Cell viability modulation through changes of Ca(2+)-dependent signalling pathways. *Prog. Biophys. Mol. Bio.* v. 121, n. 1, p. 45-53, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2016.01.004>

Wolf F. I., Cittadini A., Magnesium in cell proliferation and differentiation. *Frontiers Biosci.* v. 4, n. 4, p. D607-17, 1999.

<https://doi.org/10.2741/A458>

XIA T., KOVOCHICH M., LIONG M., MÄDLER L., GILBERT B., SHI H., YEH J. I., ZINK J. I., NEL A. E., Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. *ACS Nano*. v. 2, n. 10, p. 2121-2134, 2008.
<https://doi.org/10.1021/nm800511k>

XIA T., ZHAO Y., SAGER T., GEORGE S., POKHREL S., LI N., SCHOENFELD D., MENG H., LIN S., WANG X., WANG M., JI Z., ZINK J. I., MÄDLER L., CASTRANOVA V., LIN S., NEL A. E. Decreased dissolution of ZnO by iron doping yields nanoparticles with reduced toxicity in the rodent lung and zebrafish embryos. *ACS Nano*. v. 5, n. 2, p. 1223-1235, 2011.
<https://doi.org/10.1021/nm1028482>

YANG Q., ZHU L., JIN L. Human Follicle in vitro Culture Including Activation, Growth, and Maturation: A Review of Research Progress. *Front Endocrinol*. v.11, n.11, p.548, 2020.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00548>

ZHANG C., LI H. Effects of calcium channel on ovarian cancer cells. *Oncol. Lett*. v. 14, n. 6, p. 6341-6344, 2017.
<https://doi.org/10.3892/ol.2017.7061>