

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CAROLINE PALMIERI PITANGUI

Determinação do perfil lipídico por espectrometria de massas de oócitos
bovinos maturados em meio suplementados com fosfolípido: uma nova
estratégia para modular a criotolerância oocitária

Ribeirão Preto

2012

CAROLINE PALMIERI PITANGUI

Determinação do perfil lipídico por espectrometria de massas de oócitos bovinos maturados em meio suplementados com fosfolípido: uma nova estratégia para modular a criotolerância oocitária.

Dissertação de mestrado apresentada no curso de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Biologia da Reprodução

Orientadora: Professora Doutora Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

Ribeirão Preto

2012

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Pitangui, Caroline Palmieri.

Determinação do perfil lipídico por espectrometria de massas de oócitos bovinos maturados em meio suplementados com fosfolipídio: uma nova estratégia para modular a criotolerância oocitária, 2012.

77 p. il., 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia da Reprodução

Orientador: Rosa-e-Silva, Ana Carolina Japur de Sá.

1.Oócito 2.Maturação *in vitro* 3.Fosfolipídios. 4.Perfil lipídico
5.Espectrometria de massas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Caroline Palmieri Pitangui

Determinação do perfil lipídico por espectrometria de massas de oócitos bovinos maturados em meio suplementado com fosfolipídio: uma nova estratégia para modular a criotolerância oocitária.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Biologia da Reprodução

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a).: _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof (a). Dr (a).: _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof (a). Dr (a).: _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof (a). Dr (a).: _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof (a). Dr (a).: _____

Instituição _____ Assinatura _____

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho aos meus pais, **Nilda e Paulo**, por todo empenho, esforço, dedicação, amor e carinho dados durante toda minha vida. Vocês são meu porto seguro, e se hoje eu cheguei até aqui, foi graças a vocês. Amo vocês.

À minha irmã **Catarine**, uma irmã sensacional, amiga, companheira, que sempre esteve presente na minha vida, e que sempre me serviu de espelho para que eu nunca desistisse.

Ao meu marido **Lincoln**, por ser essa pessoa incrível, maravilhosa, além de ser um grande companheiro, amigo e o amor da minha vida. Sempre esteve do meu lado em todos os momentos me dando força. Obrigada pela compreensão nos momentos de ausência.

À minha madrinha **Rosana**, minha segunda mãe, por ter me recebido de braços abertos quando cheguei, e por todo carinho, atenção e amor dados durante toda minha vida. Uma madrinha maravilhosa.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiramente à **Deus**, pelo dom da vida, e por sempre guiar meus passos, me levando para o caminho certo.

À minha orientadora **Prof^a Dr^a Ana Carolina**, que foi uma mãe durante todo o desenvolvimento deste trabalho, pela paciência, pelos abraços nas horas de desespero, por ser essa pessoa sensacional.

À **Alessandra Vireque**, que se tornou uma grande amiga, pelos treinamentos e ensinamentos realizados, e por toda dedicação, carinho e companhia. Uma pessoa forte, guerreira, a qual foi de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Daiane Lopes Bulgarelli**, por ter me dado o ensinamento inicial no momento em que cheguei ao laboratório. Além da paciência, dedicação, compreensão, amizade e companhia. Uma pessoa muito especial.

AGRADECIMENTOS

As pós-graduandas **Jacira Ribeiro Campos, Micheli Gomes da Broi, Camila de Moraes Bonoche, Helena Malvezzi, Carolina de Oliveira Campos, Daiana Pedroso, Gabriela Hidalgo, Fernanda Marques, Fabiene Ramos, Luciene Batista e Catiele Garcia** e aos pós doutores **Juliana Meola, Marcelo Bernuci e Mary Montenegro** pela ajuda, amizade, companheirismo, risadas e brincadeiras. Sem vocês eu não teria conseguido. Muito obrigada. Adoro vocês!

Ao **Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia**, em especial aos **funcionários do Setor de Reprodução Humana, Maria Albina, Tatiana, Débora, Eduardo, Marisa, Maria Auxiliadora, Sandra, Adriana, Maria Balbino, Océlia, Cristina Brentigani, Cristina Piccinato, Roberta Giorgenon, Camila Kokudai, Marilda Yamada e Maria Aparecida Vasconcelos** pela compreensão, atenção e ajuda para o desenvolvimento desse trabalho.

À **Cristiana Ribas**, pela paciência, pelas brincadeiras e grande amizade. Uma pessoa maravilhosa que me ajudou bastante, principalmente nas horas de aperto.

À **Suelen Soares e Ilza Mazzocato** pela atenção, paciência e grande ajuda nos momentos que precisei.

Ao **Departamento de Ginecologia e Obstetrícia** por ter me dado oportunidade, abrindo as portas para que eu desenvolvesse este trabalho.

Ao pessoal do **Laboratório Thomsom** pela oportunidade em desenvolver este trabalho com vocês, em especial ao professor **Dr. Marcos Eberlin, Christina Ferreira, Alessandra Tata e Vanessa Gonçalves** pela dedicação, ajuda e atenção.

Aos meus familiares **Tia Cidinha, Tio Jair, Rosângela e Anne** por todo carinho, atenção e dedicação durante todo esse tempo. Vocês são muito especiais.

Aos **meus amigos** que sempre estiveram do meu lado torcendo por mim e me apoiando.

Epígrafe

"Quem perde seus bens, perde muito.
Quem perde um amigo perde muito mais.
Mas quem perde sua coragem perde tudo."

(Miguel de Cervantes)

RESUMO

O interesse em criopreservar tecido ovariano, embriões e oócitos, principalmente quando se trata de pacientes oncológicas que irão ser submetidas a tratamentos potencialmente esterilizantes, vem crescendo nas últimas duas décadas. Uma das técnicas propostas para se preservar a fertilidade destas pacientes é o congelamento de oócitos, podendo estes ser obtidos já maturados *in vivo* após a hiperestimulação ovariana controlada ou na forma de oócitos imaturos na ausência de estimulação, nestes casos procede-se a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos pré congelamento. No entanto sabe-se que a criopreservação causa danos de viabilidade e perda do potencial reprodutivo destes oócitos. Alguns autores têm demonstrado que esses danos podem ser reduzidos por meio de cultivos que modulam o perfil lipídico tanto de oócitos como embriões, fazendo com que estes sejam menos susceptíveis ao congelamento. Uma das técnicas que permite a verificação da composição lipídica de células e outras estruturas é a espectrometria de massas. Os objetivos deste estudo foram comparar o perfil lipídico de oócitos maturados *in vitro* na presença ou ausência de PL e correlacionar com o perfil lipídico e desenvolvimento embrionário dos embriões produzidos *in vitro*. Além disso, avaliamos o perfil lipídico dos meios de maturação usando oócitos bovinos como modelo experimental. CCOs foram maturados em meio TCM ou TCM + PL, contendo 10% de soro fetal bovino, 0,5 µg/ml de FSH, 5 ng/ml de LH e 1 mg/mL de 17β-estradiol em atmosfera úmida, com 5% de CO₂ durante 24 horas. Após a MIV, os oócitos foram desnudados mecanicamente, lavados em PBS e armazenados a -80 ° C, até a análise de perfil lipídico. Oócitos, meios de maturação e blastocistos foram submetidos à técnica de

MALDI-MS (ionização e dessorção a laser assistida por matriz /espectrometria de massas). Diferenças no perfil lipídico foram identificadas por PCA (análise de componentes principais). O perfil lipídico dos meios de maturação determinado por MALDI-MS permitiu a diferenciação entre TCM e TCM + PL. No entanto, a análise dos oócitos maturados *in vitro* demonstrou que o perfil lipídico dos grupos controle ou suplementado com PL não foram diferentes. Da mesma forma, não foram observadas diferenças no perfil lipídico e na embriogênese dos embriões resultantes. No entanto, diferenças no perfil lipídico entre COC e oócitos desnudos (ODs) maturados *in vitro* foram detectadas. Oócitos maturados com as células do cumulus contêm íons PC com maiores graus de insaturação dos resíduos de ácidos graxos, enquanto ODs contêm espécies de PC com ácidos graxos insaturados (18:0) ou monoinsaturados (18:1). O MALDI-MS permite a obtenção de perfis lipídicos informativos para meios de cultura e oócitos maturados *in vitro*. A identificação de mudanças no metabolismo lipídico de oócitos durante a MIV pode contribuir para determinar a suplementação lipídica adequada dos meios de MIV e soluções de vitrificação, contribuindo para otimizar os protocolos de criopreservação de oócitos humanos.

Palavras-chave: oócito; maturação *in vitro*; fosfolipídios; perfil lipídico, espectrometria de massas.

ABSTRACT

The interest in ovarian tissue, embryos and oocytes cryopreservation has been growing in the last two decades, especially in patients who are faced with potentially sterilizing treatments. One of the techniques proposed to preserve the fertility of these patients is the oocyte cryopreservation. The oocytes can be obtained matured *in vivo* after controlled ovarian hyperstimulation or as immature oocytes, in the absence of stimulation. In these cases, an option is to proceed the *in vitro* maturation (IVM) of oocytes before cryopreservation. However, it is known that damage induced by cryopreservation is associated with loss of viability and reproductive potential of oocytes. Some authors have demonstrated that such damage can be reduced by culture media that modulate lipid profile in both oocytes and embryos, making them less susceptible to freezing. One technique that enables the determination of the lipid composition of cells and other structures is mass spectrometry. The objectives of this study were to compare lipid profiles of oocytes matured *in vitro* in the presence or absence of PL and relate this information to lipid profile and preimplantational development of IVM-derived embryos. Also, we evaluated the lipid profiles of culture media using bovine oocytes as an experimental model. COCs were matured in TCM or TCM + PL, both containing 10% fetal calf serum, 0,5µg/ml FSH, 5 µg/mL LH, and 1 µg/mL 17β-estradiol, with 5% CO₂ for 24 h. After IVM, oocytes were mechanically denuded, washed in PBS and stored at -80°C, until lipid analysis. Oocytes, maturation media and blastocysts were submitted to the MALDI-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry). Differences in lipid profile were addressed by principal component analysis. Maturation media lipid

fingerprint by MALDI-MS allows differentiation among TCM and TCM+PL. However, the MALDI-MS of the *in vitro* matured oocytes demonstrated that lipid profile of control or PL-supplemented groups were not different. Similarly, no differences were observed in the lipid profile and embryogenesis of resulting embryos. Nevertheless, differences in lipid profiles between COCs and denuded oocytes (DOs) matured *in vitro* were indicated to occur. The former contain PC ions with higher degrees of unsaturation in the fatty acid residues, while DOs contain PC ions with unsaturated (18:0) or monoenoic (18:1) fatty acids.

The MALDI-MS has allowed obtaining informative lipid profiles for culture media and IVM-oocytes. Identification of lipid changes during IVM may contribute to determine appropriate lipid supplementation of IVM/vitrification media and to improve cryopreservation of human oocytes.

Keywords: oocyte; *in vitro* maturation; phospholipid; lipid profile; mass spectrometry

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fosfolipídios (PLs) e triacilgliceróis (TAGs) identificados pela técnica de MALDI-MS em oócitos e embriões bovinos.....	18
Tabela 2 - Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i> em meio TCM199 convencional ou suplementado com PL.....	26
Tabela 3 - Valores de <i>m/z</i> dos lipídios observados nos oócitos (grupo CCO ou OD), embriões e meio TCM199.....	32
Tabela 4 - Espécies de fosfatidilcolinas (PC) e esfingomielinas (SM) indicadas por PCA nos grupos de oócitos maturados maturados <i>in vitro</i> (CCO ou OD).....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama esquemático mostrando como os ácidos graxos saturados favorecem o estado rígido da membrana plasmática pela interação facilitada das caudas hidrocarbonadas retas (A). Ao contrário, nos lipídios insaturados, a dupla ligação produz uma dobra na cauda, dificultando a organização entre as cadeias na bicamada lipídica, o que resulta em maior fluidez (B).....	4
Figura 2 - Delineamento do experimento 1.....	20
Figura 3 - Delineamento do experimento 2.....	21
Figura 4 - Delineamento do experimento 3.....	22
Figura 5 - Delineamento do experimento 4.....	23
Figura 6 - Espectro de massa contendo as espécies moleculares de fosfocolinas pertencentes ao PL (99% de pureza) adicionado ao meio de maturação <i>in vitro</i> . Os espectros foram obtidos por MALDI-TOF MS com matriz DHB em modo positivo de ionização.....	25
Figura 7 - Espectros de massas contendo o perfil lipídico dos meios de maturação <i>in vitro</i> . Os espectros foram obtidos por MALDI-TOF MS com matriz DHB em modo positivo de ionização. (A) Meio TCM controle, (B) Meio TCM + PL. Em A observam-se várias espécies de fosfatidilcolinas e valor de m/z correspondente a TAG. Em (B) pode-se observar diversos valores de m/z correspondentes ao fosfolipídio adicionado ao meio.....	25
Figura 8 - Distribuição percentual da clivagem, formação de blastocistos e eclosão de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> , oriundos de oócitos maturados em meio TCM199 convencional ou suplementado com PL.....	27

Figura 9 - Espectros de massas contendo o perfil lipídico dos embriões produzidos *in vitro*, oriundos de oócitos maturados em TCM controle ou TCM + PL. Os espectros foram obtidos por MALDI-TOF MS com matriz DHB em modo positivo de ionização. (A) Embriões do grupo TCM controle, (B) Embriões do grupo TCM suplementado com PL.....28

Figura 10 - Comparação por PCA dos embriões resultantes de oócitos maturados *in vitro* em meio TCM controle (íons identificados em vermelho) ou TCM + PL (íons identificados em verde).....29

Figura 11 - Espectros de massas contendo o perfil lipídico dos CCOs maturados em TCM controle (A), ou TCM + PL (B); e perfil lipídico de oócitos maturados desnudos (OD) em TCM controle (C) ou TCM + PL (D). Os espectros foram obtidos por MALDI-TOF MS com matriz DHB em modo positivo de ionização.....30

Figura 12 - Comparação por PCA dos oócitos maturados com as células do cumulus (CCOs) dos grupos controle e suplementado com PL (A). PCA dos oócitos maturados desnudos (OD) dos grupos controle e suplementado com PL (B). Observa-se a separação dos íons entre os grupos de oócitos desnudos (identificados em vermelho e verde) e os complexos *cumulus oophorus* (identificados em azul claro e azul escuro), indicando a diferença entre estes grupos.....31

Figura 13 - Comparação por PCA dos CCOs e oócitos desnudos maturados *in vitro* em meio TCM controle ou TCM + PL. Observam-se os íons responsáveis pela separação dos grupos CCOs (identificados em azul claro e azul escuro) e oócitos desnudos (verde e vermelho). Íons comuns aos dois grupos são identificados na cor cinza.....31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MIV – maturação *in vitro*

PL - fosfolípido

FIV – fecundação *in vitro*

CIV – cultivo *in vitro*

TRA – tecnologia de reprodução assistida

HOC – hiperestimulação ovariana controlada

TAGs – triacilgliceróis

MS – espectrometria de massa

MII – metáfase II

GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas

CG – células da granulosa

CT – células da teca

PC – fosfatidilcolina

SM – esfingomielina

SFB – soro fetal bovino

D10 – décimo dia de cultivo embrionário

CCO – complexo cumulus-oócito

LH – hormônio luteinizante

FSH – hormônio folículo estimulante

PL – fosfolípido

PVA – álcool polivinílico

OD – oócito desnudo

DHB – ácido 2,5 di-hidroxibenzóico

PCA – análise dos componentes principais

CIV – cultivo in vitro

PIV – produção in vitro

TCM-199 – meio de cultura tecidual 199

MALDI - Matrix assisted laser dissociation ionization - Ionização por dissociação a laser assistida por matriz

MS - Mass Spectrometry - Espectrometria de massas

m/z - Razão Massa sobre Carga

PCA - Principal Component Analysis ± Análise de Componentes Principais

TOF - Time of flight - Tempo de vôo

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Metabolismo lipídico de oócitos e embriões.....	3
1.2. Espectrometria de massas.....	6
1.3. Suplementação lipídica dos meios de maturação <i>in vitro</i> e no cultivo <i>in vitro</i> de embriões.....	9
2. Justificativa.....	12
3. Objetivos.....	13
4. Materiais e métodos.....	14
4.1. Reagentes e Meios de cultura para a produção <i>in vitro</i> de embriões.....	14
4.2. Isolamento e seleção de complexos cumulus-oócito (CCOs).....	14
4.3. Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	15
4.4. Produção <i>in vitro</i> dos embriões.....	15
4.5. Determinação do perfil lipídico dos meios de maturação, oócitos e embriões pela técnica de MALDI-MS.....	16
4.5.1. Preparo da Amostra.....	16
4.5.2. Aquisição de Dados pelo MALDI-MS.....	17
4.6. Análise estatística.....	18
4.7. Delineamento experimental.....	20
4.7.1. Experimento 1: Desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i> de oócitos maturados em meio convencional ou suplementado com PL.....	20
4.7.2. Experimento 2: Análise do perfil lipídico de embriões provenientes de oócitos maturados <i>in vitro</i> em meio convencional ou suplementado com PL.....	21
4.7.3. Experimento 3: Análise do perfil lipídico de CCOs maturados em meio	

convencional ou suplementado com PL.....	22
4.7.4. Experimento 4: Análise do perfil lipídico de OD maturados em meio convencional e suplementado com PL.....	23
5. Resultados.....	24
5.1. Perfil lipídico dos meios de maturação in vitro.....	24
5.2. Influência da suplementação do meio de maturação in vitro com PL no desenvolvimento embrionário inicial.....	26
5.3. Influência da suplementação do meio de maturação in vitro com PL no perfil lipídico de embriões.....	28
5.4. Perfil lipídico dos complexos cumulus oophorus (CCOs) e de oócitos desnudos maturados in vitro em meio suplementado com PL.....	29
5.5. Identificação dos principais íons obtidos com os espectros de massas.....	32
6. Discussão.....	33
7. Conclusões.....	40
8. Referências.....	41
Anexo A.....	47
Manuscrito: Lipid profile of bovine oocytes matured in medium supplemented with phospholipid: new strategies to modulate oocyte cryotolerance.....	48

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação de oócitos, embriões e tecido ovariano vem surgindo como importante técnica aplicada na tecnologia da reprodução assistida (TRA) humana, principalmente para pacientes em tratamento oncológico (MARHHOMN, COHEN, 2006). No entanto, para a obtenção de oócitos maduros e fertilizáveis é necessária a realização da hiperestimulação ovariana controlada (HOC) com gonadotrofinas exógenas a fim de otimizar o ciclo de indução aumentando o recrutamento oocitário (LEE et al., 2006; ETHICS COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY OF REPRODUCTIVE MEDICINE, 2005). Esta HOC implica não só em aumento de custo no procedimento como também em adiamento do início do tratamento oncológico (DAVIS, 2006; MARHHOM; COHEN, 2006). Além disso, em casos de tumores estrogênio dependentes, existe ainda a contra-indicação ao uso de gonadotrofinas já que estas produzem uma elevação significativa nos níveis de estradiol endógeno.

Tanto o congelamento de embriões como de oócitos são efetivos do ponto de vista reprodutivo, com taxas de gestação bastante satisfatórias. Do ponto de vista ético e legal a criopreservação de oócitos, por se tratarem de células únicas com possibilidade de descarte em caso de óbito ou não utilização, são mais facilmente manejadas nos bancos de células germinativas dos centros de Reprodução Assistida (CHA; CHIAN, 1998; YANG et al., 2007; GIDONI et al., 2008; PARMEGIANI et al., 2008; PORCU et al., 2008; CHIAN et al., 2009). Entretanto, assim como os embriões, o congelamento de oócitos maduros demanda a realização de HOC, com todas as suas implicações clínicas.

No intuito de minimizar custos e os efeitos colaterais advindos do uso das gonadotrofinas alguns autores propuseram a punção dos oócitos ainda imaturos e a aplicação da maturação *in vitro* (MIV), para posteriormente realizar-se a

criopreservação desses oócitos já maturados (CHA; CHIAN, 1998; TUCKER et al., 1998; REVEL; LAUFER, 2002; DONNEZ et al., 2006; LIN; HWANG, 2006).

Durante o processo de criopreservação de oócitos, independente do estágio de maturação no momento do congelamento, parte das células preservadas perdem sua viabilidade ou mantêm-se viáveis, porém perdem sua capacidade reprodutiva (SHAW et al., 2000; MASSIP, 2003; VAJTA; KUWAYAMA, 2006; BULGARELLI et al., 2011, dados não publicados). Dentre as lesões induzidas pelo congelamento, o dano da membrana é uma das principais razões apontadas para morte celular nos processos de criopreservação (WATSON, 1995; WATSON, 2000).

Considerando-se que o lipídio é o constituinte principal das membranas celulares, o dano na mesma pode estar relacionado à mudança na sua composição lipídica produzida durante o processo de congelamento (KUNDU et al., 2000). Há grande escassez de dados na literatura sobre modulação de criotolerância em oócitos. Mas segundo PEREIRA et al. (2004), cultivo de embriões bovinos em meio contendo ácido linoleico conjugado (CLA), tem um efeito positivo pós-criopreservação no aumento das taxas de sobrevivência embrionária. Da mesma forma, RICKER et al. (2006) mostraram que na criopreservação de sêmen quando utiliza-se crioprotetores com predominância lipídica na sua composição como fosfolipídios, obtidos do ovo ou da soja, as taxas de fertilização pós-congelamento são semelhantes às do sêmen fresco. E CHAKRABARTY et al. (2007) também sugerem que o aumento do componente lipídico das membranas, aumenta a resistência de espermatozóides à criopreservação. Ressaltamos que este efeito positivo dos lipídios sobre a criotolerância de embriões e gametas pôde ser observado com a utilização de ácidos graxos livres insaturados.

Já quando observamos os estudos de ABE et al. (2002) verificamos que o acréscimo de soro ao meio de cultivo promove o aumento de gotículas lipídicas

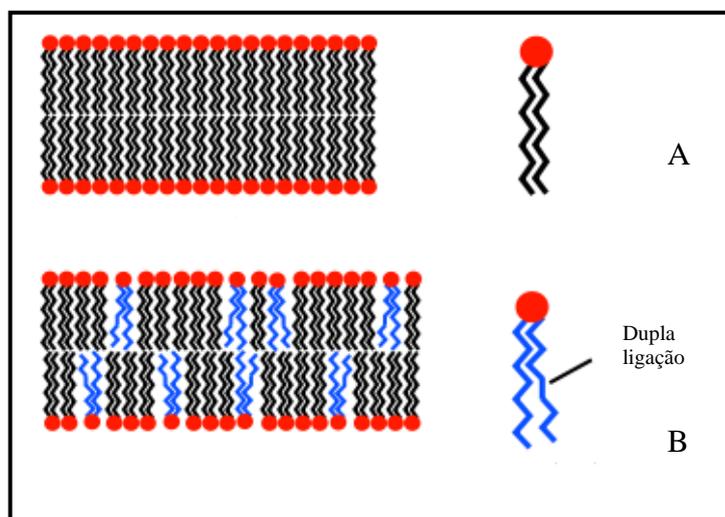
constituídas predominantemente de triacilgliceróis (TAGs) no interior dos embriões, e isso acarreta a redução da criotolerância dos mesmos. Fica evidente que o papel benéfico do lipídio observado com ácidos graxos insaturados não aparece em situações de suplementação de meios com soro rico em TAGs, indicando a importância da insaturação das cadeias lipídicas nas propriedades biofísicas associadas à resistência ao congelamento.

Esta estratégia de manipulação dos meios de cultivo através do acréscimo de diferentes componentes produzindo mudanças estruturais que podem vir a influenciar na criotolerância destas células, aparece como boa opção para melhorar as taxas de sucesso destes procedimentos de criopreservação. Sendo assim, estudos que analisem de forma sistemática a composição de lipídios das membranas celulares de oócitos e a influência da suplementação de diferentes componentes lipídicos no meio em relação à composição destas membranas, poderá contribuir na melhoria dos protocolos de criopreservação através da minimização de danos à membrana durante o congelamento. Dentre as técnicas que permitem a avaliação da composição de amostras biológicas destaca-se a espectrometria de massas (MS), que identifica diferentes componentes da amostra através das diferenças de massa molecular de cada um.

1.3. Metabolismo lipídico de oócitos e embriões

Os lipídios são fontes de nutrientes para as células, as quais regulam constantemente sua composição, principalmente de fosfolipídios (PLs) e colesterol, e sua temperatura, para obter fluidez na membrana plasmática nas várias condições de crescimento (LEE, 1975). A fosfatidilcolina, um dos fosfolipídios que compõem a membrana, desempenha uma função importante no metabolismo oxidativo dos ácidos

graxos e contribui para a propriedade de fluidez da bicamada lipídica das membranas (JEFFERY et al., 1996; DE PABLO et al., 2000). Acima de uma determinada temperatura os lipídios podem apresentar grande movimentação, já em temperaturas baixas ocorre pouca movimentação lipídica e a bicamada aparece de forma quase cristalina (paracristalina) (LEHNINGER et al., 2002). Uma das propriedades mais importantes da bicamada lipídica da membrana celular é a mobilidade relativa (fluidez) das moléculas de fosfolipídios individuais e como essa fluidez muda em função da temperatura, presença de insaturações nos fosfolipídios e comprimento das cadeias lipídicas (Figura 1). Resumidamente, a uma dada temperatura a bicamada lipídica pode apresentar-se na forma líquida ou na fase sólida, referida como gel. Todos os lipídios têm uma temperatura característica na qual sofrem uma transição a partir de gel para a fase líquida (LEHNINGER et al., 2002).



Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_bilayer

Figura 1. Diagrama esquemático mostrando como os ácidos graxos saturados favorecem o estado rígido da membrana plasmática pela interação facilitada das caudas hidrocarbonadas retas (A). Ao contrário, nos lipídios insaturados, a dupla ligação produz uma dobra na cauda, dificultando a organização entre as cadeias na bicamada lipídica, o que resulta em maior fluidez (B).

Os PLs da membrana são também importantes fontes de moléculas sinalizadoras. Durante a transmissão de sinal, metabólitos gerados por PLs, por ação de diferentes fosfolipases, podem inibir ou ativar vias de sinalização intracelular, alterar o metabolismo celular, a expressão gênica e a função da célula (JEFFERY et al., 1996; DE PABLO et al., 2000). Além disso, transporte de substâncias através da membrana celular também é um processo importantíssimo indiretamente relacionado aos lipídios, onde tanto pode haver o influxo de substâncias para o seu interior como a excreção de metabólitos e subprodutos de seus processos vitais. A passagem transmembrana de compostos polares e íons tornam-se possíveis devido à presença de proteínas de membrana que diminuem a energia de ativação do transporte, fornecendo uma via alternativa para solutos específicos através da bicamada lipídica (LEHNINGER et al., 2002).

Outro papel importante dos lipídios está relacionado ao metabolismo energético durante a maturação do oócito, fertilização e desenvolvimento embrionário precoce. Quando uma célula ou organismo tem em disponibilidade combustível metabólico mais que suficiente para suprir suas necessidades energéticas de momento, o excesso é em geral convertido em ácidos graxos e armazenados como TAGs. A reação catalisada pela acetil-CoA carboxilase é o passo limitante da velocidade na biossíntese dos ácidos graxos e essa enzima é um sítio importante de regulação. Já o citrato desempenha um papel central na passagem do metabolismo celular de consumidor de combustível metabólico (oxidação) para o de armazenador de ácidos graxos na forma de TAGs (LEHNINGER et al., 2002).

Assim sendo, dentre os lipídios, os TAGs tem como principal função reserva de energia metabólica, e são abundantes em embriões suínos e oócitos bovinos e suínos

(YOUNGS et al., 1994; MCEVOY et al., 2000). Um consumo deste lipídio durante a maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário tem sido demonstrado através da documentação da redução do mesmo nos meios de cultivo (consumo). Neste período ocorre a síntese proteica, retomada da meiose e maturação citoplasmática (FERGUSON; LEESE, 1999; KIM et al., 2001; CETICA et al., 2002), todos processos com alta demanda energética.

Muitas são as funções dos lipídios no metabolismo embrionário, e os dados sobre oócitos em termos de análise qualitativa e quantitativa do conteúdo de ácidos graxos e lipídios ainda são limitados, bem como o conhecimento sobre o metabolismo lipídico durante a maturação oocitária. Mas sabe-se que os lipídios exercem importante papel na regulação das propriedades físicas e funcionais das membranas biológicas, auxiliando nas interações intercelulares, proliferação e transporte celular (STUBBS; SMITH, 1984; KIM et al., 2001; STURMEY et al., 2009), bem como nos processos de sinalização intracelular. Novas tecnologias para melhor compreensão da composição química de oócitos e embriões vem sendo definidas, dentre elas a espectrometria de massas (MS).

1.4. Espectrometria de massas

Lipidômica é um campo de pesquisa emergente e consiste em técnicas analíticas para obtenção de um “perfil de lipídios”, que contém informação sobre a composição e abundância de lipídios individuais, e também estudos para melhor compreender as funções dos lipídios em uma determinada amostra biológica (ROBERTS et al., 2008; WATSON, 2006).

Devido aos avanços obtidos nos últimos anos nas plataformas “*omics*”, como genômica, transcriptômica, metabolômica, proteômica, lipidômica, entre outras, e desenvolvimento dos equipamentos e técnicas analíticas sensíveis e seletivas, a aplicação da técnica de espectrometria de massas (MS) vem aumentando consideravelmente em estudos biológicos (HOFFMANN; STROOTBART, 2007; FENG et al., 2008; ROBERTS et al., 2008; EJSING et al., 2009). No entanto, as alterações na composição dos perfis lipídicos de oócitos e embriões de mamíferos ainda não são bem compreendidos, mas sabe-se que o cultivo *in vitro* (CIV) de embriões provoca alterações lipídicas que afetam as propriedades metabólicas e a estabilidade das membranas celulares (DINNYES; NEDAMBALE, 2009; FERREIRA et al., 2009).

A MS é uma técnica microanalítica, versátil e sensível utilizada para obter informação do peso molecular e de características estruturais da amostra (VAN BRAMER, 1998), tem aplicação muito ampla e pode ser utilizada em análises quantitativas, mas é em análises qualitativas que ela tem se destacado, como na identificação de compostos em misturas e, principalmente, na caracterização estrutural de compostos desconhecidos, que pode ser alcançado através da formação de íons-molécula e de seus respectivos íons-fragmentos, por isso é valiosa em diversos estudos nas áreas de Biologia, de Ciências Médicas e de Ciências Tecnológicas (FERREIRA et al., 2009).

Através desta técnica é possível determinar a massa molecular e quantificar biomoléculas, como proteínas, carboidratos, lipídios e oligonucleotídeos, e também fragmentá-las de forma a descobrir sua estrutura e confirmar sua identificação (VAN BRAMER, 1998). Pode ser utilizada em várias áreas, como por exemplo na biotecnologia da reprodução, sendo controle dos meios de produção *in vitro* (PIV) e seus componentes, detecção de patógenos, identificação de lipídios em oócitos e

embriões, entre outras (FERREIRA et al., 2009). A análise por MS também pode ser utilizada em exames de *doping*, controle de alimentos e medicamentos, contaminação ambiental, produtos lácteos, detecção e quantificação de substâncias de uso veterinário, avaliação de alterações epigenéticas em animais clonados, dentre outras (FERREIRA et al., 2009).

Uma das técnicas de MS é a de ionização e dessorção a laser assistida por matriz – MALDI (KARAS; HILLENKAMP, 1988). Em lipidômica, esta técnica tem aquisição rápida e simples de espectros de massa com o perfil lipídico de células, tecidos e fluidos corporais, além de contribuir para os estudos de oócitos e embriões (FUCHS; SCHILLER, 2008). Esta técnica ajuda a compreender a composição da membrana plasmática e seu comportamento após mudança de temperatura, e tem obtido sucesso em estudos de composições lipídicas (TAO; DEL VALLE, 2008; KARAS; HILLENKAMP, 1988).

MS consiste na geração de íons com base em compostos (orgânicos ou inorgânicos), por meio de um método de ionização apropriado. A razão entre a massa de um determinado composto (analito) e sua carga é designada por m/z (*relação massa-carga*), e são detectados qualitativamente e/ou quantitativamente em um analisador de massas por meio de um detector, o qual “conta” os íons. A magnitude do sinal elétrico em função da razão m/z é convertida por um processador de dados, o qual gera o espectro de massas correspondente (GROSS, 2004; VAN BRAMER, 1998). O conjunto de espectros de um determinado analito permite a caracterização lipídica do mesmo e a comparação com outras substâncias.

1.3. Suplementação lipídica dos meios de maturação *in vitro* e no cultivo *in vitro* de embriões

O soro é um componente comum de meios de cultura e uma fonte útil de fatores de crescimento e outros fatores mitogênicos (CROSIER et al., 2000), mas os embriões cultivados na presença do soro acumulam excessivamente lipídios no citoplasma, preferencialmente TAGs (ABE et al., 1999; SATA et al., 1999; ABE et al., 2002; REIS et al., 2003; CROSIER et al., 2000). No entanto, o mecanismo pelo qual isso ocorre não está bem esclarecido (SHAMSUDDIN; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1994; ABE et al., 1999; ABE et al., 1999; LEROY et al., 2010). Segundo ABE et al, 2002, este acúmulo de lipídios no embrião reduz a criotolerância dos mesmos.

Células cultivadas em meio suplementado com soro podem perfeitamente captar ácidos graxos, PLs e TAGs disponíveis (SPECTOR, 1972). Embriões cultivados nestas condições apresentam mais triglicerídios e menor teor de PLs e ésteres de colesterol na sua composição quando comparados com embriões que se desenvolveram *in vivo* (SATA et al., 1999; REIS, et al., 2003; CHARPIGNY et al., 2003). Além disso, os blastocistos produzidos *in vitro* (PIV) possuem mitocôndrias imaturas e microvilosidades mais curtas e menos numerosas, similares às de embriões em estágio anterior ao de 8 células, o que mostra um atraso no desenvolvimento embrionário. As mitocôndrias constituem a central bioenergética da célula, e define a competência funcional dos oócitos (WILDING et al., 2001; Cummins, 2004), tendo papel importante também na metabolização dos lipídios. Sendo assim, o acúmulo excessivo de lipídios intracelulares está relacionado a deficiência no funcionamento mitocondrial (ABE et al., 1999; ABE et al., 1999; CROSIER et al., 2000; ABE et al., 2002).

Alguns autores demonstraram diferença no perfil de ácidos graxos de embriões cultivados na presença de soro com o de embriões cultivados em meio sem soro (SATA et al., 1999; REIS, et al., 2003; CHARPIGNY et al., 2003). Quando cultivados em meio sem soro, os embriões possuem menos gotículas lipídicas, tendo assim mais semelhança com os embriões desenvolvidos *in vivo* (ABE et al., 1999; ABE et al., 1999; ABE et al., 2002).

SAEKI et al. (1991), por exemplo, demonstraram que o soro fetal bovino (SFB), um suplemento proteico dos meios utilizados na PIV, que contém lipídios e uma série de hormônios, tem uma influência positiva nas taxas de maturação nuclear e citoplasmática. E CHOI et al. (2001) observaram que não há melhora nas taxas de desenvolvimento embrionário quando são adicionados os hormônios ao meio de maturação que não possui soro. O que mostra que o soro possui substâncias necessárias para o metabolismo das células embrionárias ademais dos hormônios.

Segundo FERGUSON; LEESE, as concentrações de TAGs de embriões bovinos produzidos *in vivo* permanecem a mesma durante todo o desenvolvimento, ou seja, desde o estágio de duas células até o estágio de blastocisto. Mas o mesmo não acontece nos embriões PIV, pois na presença de soro a quantidade de TAGs pode dobrar a partir do estágio de quatro células até o de blastocisto (FERGUSON; LEESE, 1999). Confirmando estes dados, PLANTE; KING observaram um maior número de gotículas lipídicas intracitoplasmática nos embriões PIV em relação aos blastocistos obtidos *in vivo*, semelhante a estágios mais precoces da embriogênese *in vivo* (PLANTE; KING,1994).

Muitos fatores podem melhorar a competência oocitária, produção e qualidade embrionária. No entanto, apesar de estudos sobre a influência dos meios e condições de cultivo no desenvolvimento oocitário e embrionário, os responsáveis por controlar a

habilidade de responder as condições mais adequadas de cultivo são os próprios constituintes originais do oócito (SIRARD, 2001).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando-se a importância da composição química dos oócitos na criotolerância durante os processos de criopreservação de gametas e também levando-se em consideração as evidências de que os componentes dos meios de cultivo oocitário e embrionário influenciam diretamente na composição lipídica dos mesmos, acreditamos que a suplementação do meio de MIV de oócitos bovinos com PLs poderá influenciar na estrutura e conseqüentemente nas propriedades físicas do oócito, reduzindo o impacto da criopreservação sobre a qualidade destas células.

3. OBJETIVOS

Geral

Verificar o efeito da suplementação do meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos com PLs no perfil lipídico dos oócitos e embriões cultivados e sobre os resultados de Reprodução Assistida.

Específicos

1. Verificar o efeito da suplementação do meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos com PLs em relação à:
 - produção *in vitro* de embriões avaliado pelas taxas de fertilização, clivagem, formação de blastocisto e eclosão (D10).
 - composição lipídica do embrião avaliada por espectrometria de massa.
 - composição lipídica do complexo *cumulus oophorus* avaliada por espectrometria de massa
2. Avaliar o impacto do desnudamento dos oócitos na incorporação de PLs adicionados ao meio de maturação *in vitro* avaliado por meio da espectrometria de massa.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes e Meios de cultura para a produção in vitro de embriões

Para o preparo dos meios de cultura Talp Hepes, SPTL, Fert-Talp e CR2 foram utilizados reagentes (sais) Sigma Chemical CO (St. Louis, MO). Os suplementos usados nos meios de cultura foram: Albumina Sérica Bovina fração V (Sigma), Albumina Bovina livre de ácidos graxos (Sigma), Heparina (Sigma), Soro Fetal Bovino (Invitrogen), Glicina, Glutamina, Alanina (Sigma) e Penicilina-Estreptomicina (Invitrogen).

4.2. Isolamento e seleção de complexos cumulus-oócito (CCOs)

A coleta e seleção dos CCOs foram realizadas com base em protocolo publicado anteriormente (VIREQUE et al., 2009). Os ovários foram coletados em abatedouro e transportados ao laboratório em solução fisiologia a 0,9% suplementada com 0,05 g/L de estreptomicina a 35 °C. Os ovários foram lavados em solução fisiologia a 0,9% a 35 °C e os folículos de 3-8 mm de diâmetro foram aspirados com auxílio de agulhas 21 G, adaptadas em seringas de 20 mililitros. CCOs recuperados do aspirado folicular foram lavados em meio TALP-Hepes contendo NaCl, KCl, NaHCO₃, NaH₂PO₄, Na-lactato, CaCl₂·2H₂O, MgCl₂·6H₂O, 1 M de Hepes, Pen-Strep, 100 mM Na-pyruvato and PVA ou BSA (pH 7.4) e foram morfológicamente avaliados em microscópio estereoscópio. Somente oócitos com citoplasma homogêneo e com mais de três camadas de células da granulosa foram selecionados para o estudo.

4.3. Maturação *in vitro* (MIV)

O meio de maturação usado foi o TCM-199 (Gibco / BRL, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Invitrogen Gibco / BRL), 0,2 M de piruvato de sódio, 100 IU / mL de penicilina G, 100 ug / mL estreptomicina, 0,5 ug / mL de hormônio folículo-estimulante (FSH, Folltropin-Bioniche, Canadá) e 5 ug / mL hormônio luteinizante (LH, Lutropin-Bioniche, Canadá). CCOs grau I e II foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais: a) TCM (grupo controle): CCOs maturados em meio MIV padrão e b) TCM + PL: CCOs maturados em meio de MIV suplementado com 10 μ M de fosfatidilcolina. Os oócitos foram maturados em placa de Petri de 35 mm de diâmetro, em microgotas de 100 uL recobertas com óleo mineral (sistema fechado), na densidade de 1 CCO/ 10 uL de meio durante 24 h em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 38,5 ° C.

4.4. Produção *in vitro* dos embriões

Oócitos maduros foram inseminados com espermatozóides obtidos pelo método de swim-up (PARRISH et al, 1988). O meio usado para o swim-up foi o Sperm Talp (GORDON, 1994) suplementado com 6m/ml de BSA fração V. A fertilização foi realizada em gotas de 100 μ l de meio Fert Talp (GORDON, 1994) suplementado com 20 μ g/ml de heparina e 6mg/ml de BSA fração V livre de ácidos graxos sob óleo mineral. A concentração de espermatozóides durante a fertilização foi de aproximadamente 2×10^6 /mL e os espermatozóides foram co-incubados com os CCOs durante 18 h em atmosfera úmida de 5% de CO₂ e 38,5 °C. Após a fertilização, os

oócitos foram parcialmente desnudados por pipetagem em meio Talp (GORDON, 1994) e os prováveis zigotos com até 2-3 camadas de células do cumulus foram cultivados em gotas de 50 µl de meio CR2aa (ROSENKRANKS; FIRST, 1994) suplementado com 10% de soro fetal (Invitrogen) e 1mg/ml de BSA sob óleo mineral, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ e 38,5 °C. O meio de cultura foi renovado a cada 48 horas. A taxa de clivagem foi avaliada 72 horas pós-inseminação (hpi), as taxas de mórulas e blastocistos 168-192 hpi e as taxas de eclosão 224 hpi. As taxas de clivagem e blastocistos foram calculadas com base no número de zigotos e as taxas de eclosão a partir do número de blastocistos.

4.5. Determinação do perfil lipídico dos meios de maturação, oócitos e embriões pela técnica de MALDI-MS

4.5.1. Preparo da Amostra

Cada embrião e pool de oócitos foram lavados cinco vezes em gotas de solução de PBS/metanol 1:1 (v/v) (ACS / grau HPLC; Burdick e Jackson, Muskegon, MI, EUA e Millipore, Bedford, MA, EUA) e transferidos para criotubos contendo 200 uL de PBS acrescido de 0,1% de álcool polivinílico (PVA) armazenados em freezer -80 °C até à análise. Após as amostras terem sido descongeladas, foram lavadas em solução de 1:1 (v/v) de metanol/ água ultrapura (ACS / grau HPLC; Burdick e Jackson, Muskegon, MI, EUA e Millipore, Bedford, MA, EUA). Cada embrião foi colocado sobre um *spot* na placa de MALDI com auxílio de um estereomicroscópio. Os oócitos foram colocados em grupo de 5 na mesma placa, sendo divididos em dois grupos: o grupo dos oócitos maturados com as células do cumulus oophorus (CCO) e o grupo dos oócitos desnudos, maturados sem as células do cumulus (OD). As amostras foram deixadas secar à

temperatura ambiente, e sua localização no *spot* foi anotada. Pouco antes da análise, 1 µl de matriz de ácido 2,5-di-hidroxibenzóico (DHB) 1,0 M diluído em metanol puro foi depositada sobre cada *spot* para cobrir os embriões e deixou-se secar à temperatura ambiente. Os meios TCM controle e o TCM suplementado com PL também foram analisados, colocando-se em cada *spot* 1 µl de cada meio e esperou-se secar em temperatura ambiente.

4.5.2. Aquisição de Dados pelo MALDI-MS

Dados de MALDI-MS e MALDI-MS/MS foram adquiridos em modo positivo reflectron usando o espectrômetro de massa Autoflex III MALDI-TOF(/TOF) (Brucker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os dados foram adquiridos na faixa de m/z 700-1200 utilizando uma média de 1.500 disparos de laser consecutivos com uma frequência de até 200 Hz na região de interesse, e em seguida foi observado o desaparecimento do sinal devido ao consumo da amostra. Os espectros de MALDI-MS/MS foram adquiridos selecionando o íon precursor de interesse e aumentando a energia de colisão até extensa dissociação do íon precursor por meio de colisões com argônio.

O software FlexAnalysis 3,0 (Brucker Daltonics) foi usado para tratamento dos dados. Os íons mais intensos, que eram claramente distintos do ruído, após a exclusão de sinais de isotopólogos (moléculas que diferem somente em termos de composição isotópica, ou seja, das variantes de um elemento químico particular) foram considerados em cada espectro e utilizados como o ponto de partida para pesquisar valores m/z correspondentes aos lípidos.

As espécies de PL foram identificadas com base em estudos anteriores realizados pela técnica de MALDI - MS sobre perfil lipídico (Tabela 1).

Tabela 1. Fosfolipídios (PLs) e triacilgliceróis (TAGs) identificados pela técnica de MALDI-MS em oócitos e embriões bovinos.

<i>m/z</i>	Tipos de lipídios (carbono:insaturação)
703.5	[SM (16:0) + H] +
725.5	[SM (16:0) + Na] +
731.5	[SM (18:0) + H] +
732.5	[PC (32:1) + H] +
734.6	[PC(32:0) + H] +
741.3	PC (17:0) + Na] +
746.6	PC (34:0) + H] +, PC (34:1) + H] +
753.6	[SM (18:0) + Na] +
754.6	[PC (32:1) + Na] +
756.6	[PC (32:0) + Na] +
758.6	[PC (34:2) + H] +
760.6	[PC (34:1) + H] +
762.6	[PC (34:0) + H] ⁺
768.5	[PC (34:2) + H] +
780.6	[PC (34:2) + Na] + , [PC (36:5) + H] +
782.6	[PC (36:4) + H] + , [PC (34:1) + Na] +
784.6	[PC (34:0) + Na] +
786.6	[PC (36:2) + H] +
788.6	[PC (36:1) + H] +
802.6	[PC 36:5 + Na] +
803.2	[PC (38:7) + H] ⁺
804.6	[PC (38:7) + H] + , [PC36:4 + Na] +
806.6	[PC (38:6) + H] + , [PC36:3 + Na] +
808.6	[PC (38:5) + H] + , [PC (36:2) + Na] +
810.6	[PC (38:4) + H] + , [PC (36:1) + Na] +
828.6	[PC (38:6) + Na]+
830.6	[PC (38:5) + Na] +
832.6	[PC (38:4) + Na] +
834.6	[PC (40:6) + H] +
835.6	[PC (40:6) + H] ⁺
836.6	[PC (40:5) + H] +
851.7	PPLn (50:3) + Na +
853.7	PPL (50:2)+ Na +
895.7	TAG (54:9) + Na +
907.1	[OOO, SOL (54:3) + Na] ⁺
952,6	PI (21:0) +, PI (22:6) +

Fonte: www.lipidmaps.org

Legenda: Identificação baseada em estudos anteriores. L: ácido linoleico; LN: ácido linolênico; O: ácido oleico; P: ácido palmítico; PI: fosfatidilinositol; PC: fosfatidilcolinas; S: ácido esteárico; SM: esfingomielina; TAG: triacilgliceról.

4.6. Análise estatística

Os dados contínuos como número de oócitos viáveis, taxas de clivagem, taxas de formação de blastocistos e de eclosão foram analisados por ANOVA utilizando o procedimento GLM (*PROC GLM*) do *software* SAS® 9.0. Os dados são apresentados como média e desvio-padrão e o nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha=0,05$).

Para os perfis lipídicos obtidos por espectrometria de massas, a análise dos componentes foi feita por PCA, utilizando Pirouette v.3.11 (Infometrix Inc., Woodinville, WA, USA), onde os resultados são descritos de forma qualitativa.

4.7. Delineamento experimental

4.7.1. Experimento 1: Desenvolvimento embrionário in vitro de oócitos maturados em meio convencional ou suplementado com PL

Após a seleção dos oócitos imaturos por meio da morfologia do complexo *cumulus oophorus* (CCO), os oócitos foram divididos em dois grupos:

- Grupo I: oócitos imaturos submetidos a MIV, FIV e CIV convencionais;
- Grupo II: oócitos imaturos submetidos a MIV suplementada com PL, seguidos de FIV e CIV convencionais.

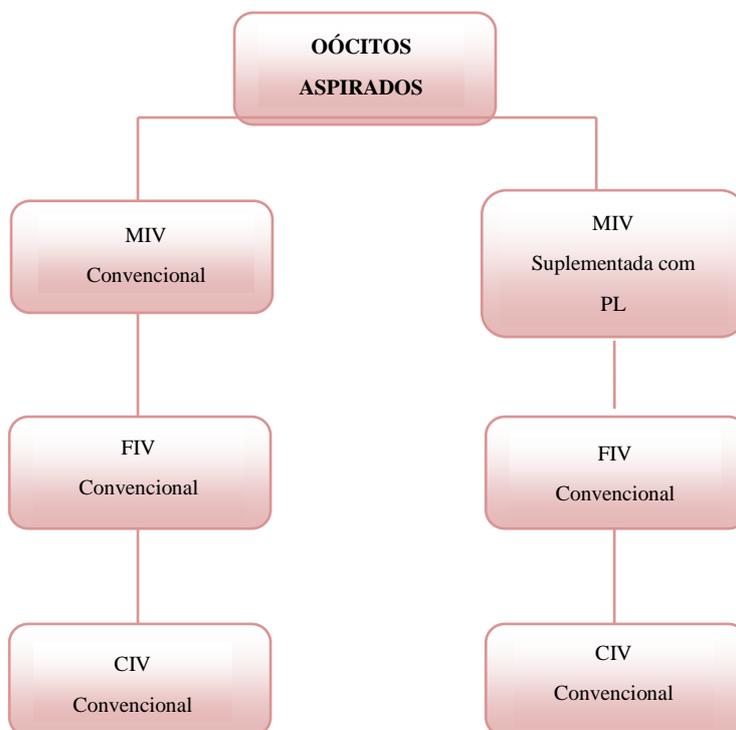


Figura 2. Delineamento do experimento 1

4.7.2. *Experimento 2: Análise do perfil lipídico de embriões provenientes de oócitos maturados in vitro em meio convencional ou suplementado com PL*

Os oócitos imaturos selecionados por meio da morfologia do CCOs foram divididos em dois grupos:

- Grupo I: constituído de oócitos imaturos submetidos à MIV, FIV e CIV convencionais, e posteriormente os embriões foram fixados para análise de perfil lipídico;
- Grupo II: oócitos imaturos submetidos a MIV suplementada com PL, FIV e CIV convencionais, e posteriormente os embriões foram fixados para análise de perfil lipídico.

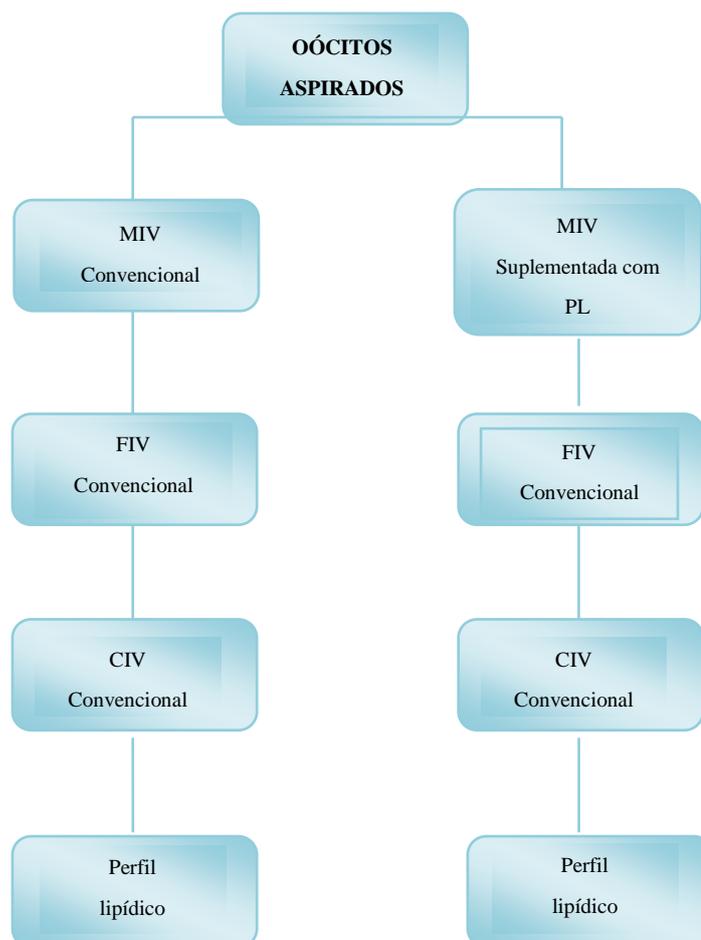


Figura 3. Delineamento do experimento 2

4.7.3. *Experimento 3: Análise do perfil lipídico de CCOs maturados em meio convencional ou suplementado com PL*

Os COCs foram selecionados e divididos em dois grupos:

- Grupo I: oócitos imaturos submetidos à MIV convencional, e fixados para análise de perfil lipídico;
- Grupo II: oócitos imaturos submetidos a MIV suplementada com PL, e fixados para análise de perfil lipídico.

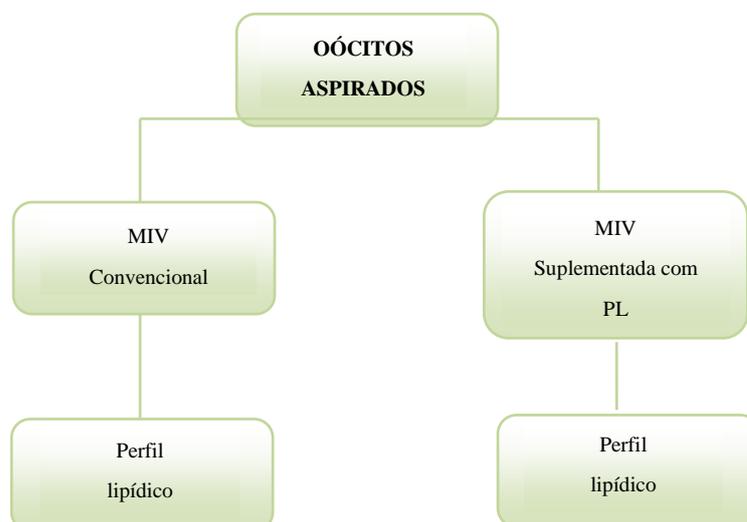


Figura 4. Delineamento do experimento 3

4.7.4. *Experimento 4: Análise do perfil lipídico de OD maturados em meio convencional e suplementado com PL*

Os oócitos foram divididos em dois grupos após a seleção dos CCOs:

- Grupo I: constituído de oócitos imaturos desnudos submetidos à MIV convencional, e posteriormente fixados para análise de perfil lipídico;
- Grupo II: oócitos imaturos desnudos submetidos à MIV suplementada com PL, e fixados para análise de perfil lipídico.

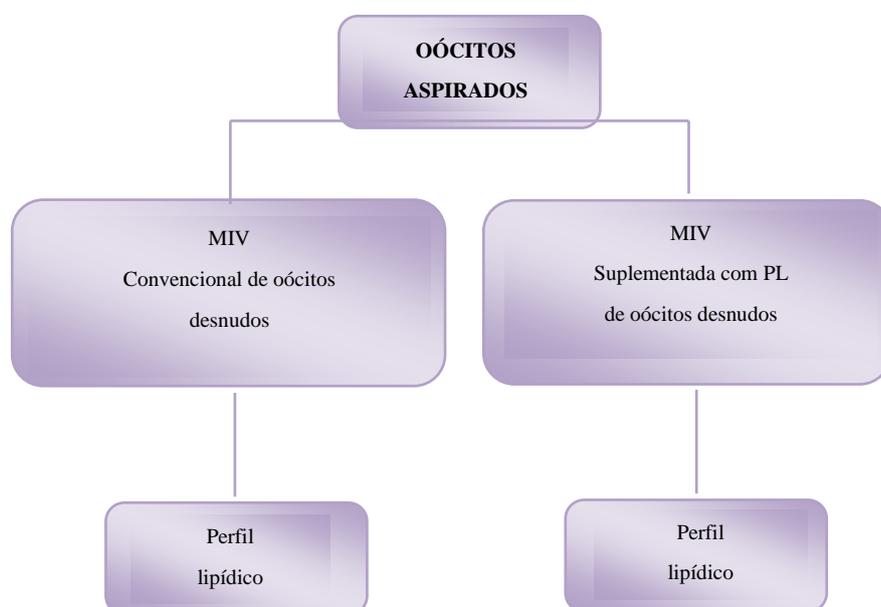


Figura 5. Delineamento do experimento 4

5. Resultados

5.1. Perfil lipídico dos meios de maturação *in vitro*

Foram obtidos perfis lipídicos informativos dos meios de maturação *in vitro* pela técnica de espectrometria de massas (MALDI – TOF MS). No meio TCM controle, é possível observar várias espécies moleculares de fosfatidilcolinas, além de (TAG) composto por duas moléculas de ácido palmítico e uma molécula de ácido linoleico (PPL). No meio TCM + PL, predominam as espécies de fosfatidilcolinas pertencentes ao PL acrescentado ao meio. Nos espectros de massa obtidos esta é a principal diferença encontrada entre o meio convencional e o suplementado (figuras 6 e 7).

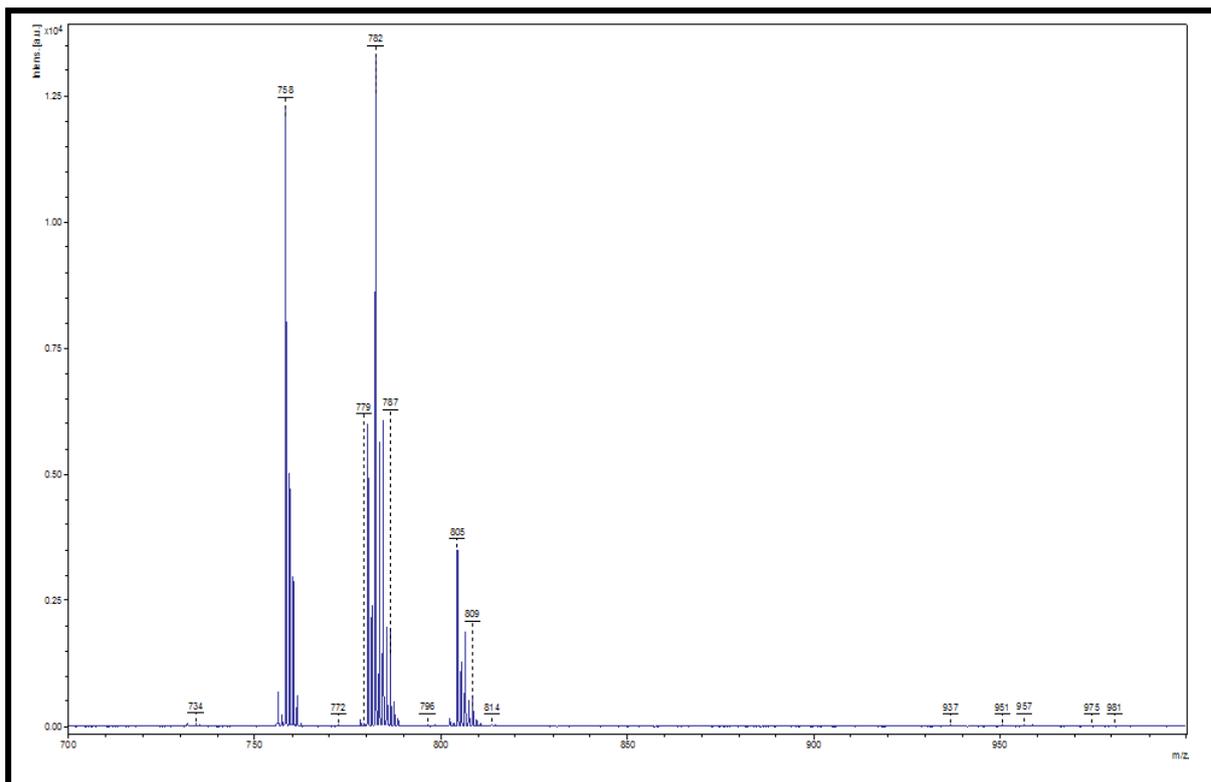


Figura 6. Espectro de massa contendo as espécies moleculares de fosfolípidos pertencentes ao PL (99% de pureza), adicionado ao meio de maturação *in vitro*. Os espectros foram obtidos por MALDI-TOF MS com matriz DHB em modo positivo de ionização.

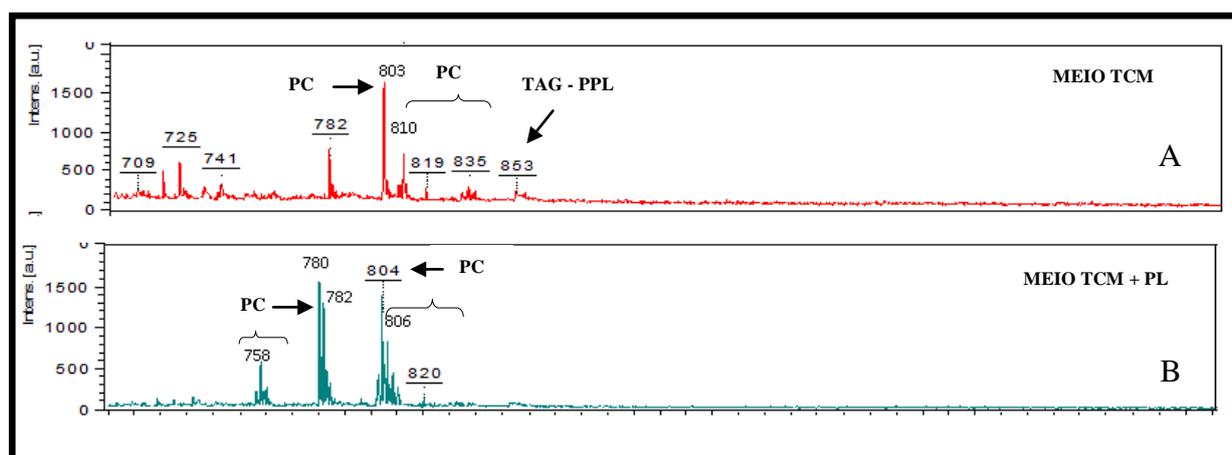


Figura 7. Espectros de massas contendo o perfil lipídico dos meios de maturação *in vitro*. Os espectros foram obtidos por MALDI-TOF MS com matriz DHB em modo positivo de ionização. (A) Meio TCM controle, (B) Meio TCM + PL. Em A observam-se várias espécies de fosfatidilcolinas e valor de m/z correspondente a TAG. Em (B) pode-se observar diversos valores de m/z correspondentes ao fosfolípido adicionado ao meio Ver tabela 3.

5.2. Influência da suplementação do meio de maturação *in vitro* com PL no desenvolvimento embrionário inicial

Não houve diferença nas taxas de clivagem, taxas de formação de blastocisto e de eclosão dos embriões oriundos de oócitos maturados em meio convencional ou suplementado com PL (Tabela 2; Figura 8).

Tabela 2. Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio TCM199 convencional ou suplementado com PL

Tratamento	Total oócitos	% Clivagem (<i>n</i>) 72 hpi	% Blastocistos (<i>n</i>) 168-192 hpi	% Eclosão (<i>n</i>) 224 hpi
TCM	563	82,23 (463) ^a	43,69 (246) ^a	69,1 (170) ^a
TCM+PL	553	81,37 (450) ^a	45,38 (251) ^a	69,3 (174) ^a

HPI: horas pós-inseminação; Valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem (P<0,05)

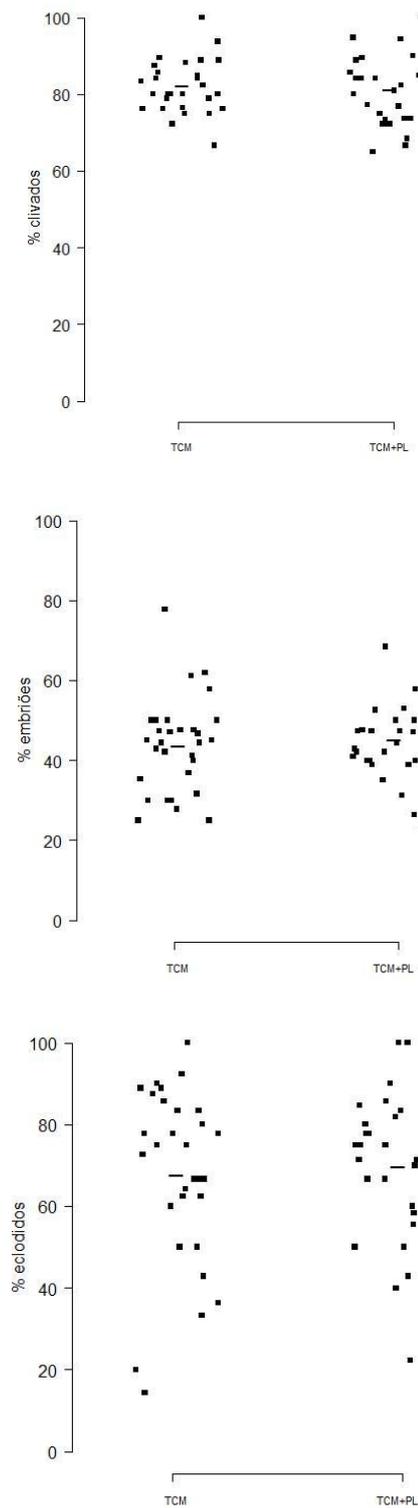


Figura 8. Distribuição percentual da clivagem, formação de blastocistos e eclosão de embriões bovinos produzidos *in vitro*, oriundos de oócitos maturados em meio TCM199 convencional ou suplementado com PL.

5.3. Influência da suplementação do meio de maturação *in vitro* com PL no perfil lipídico de embriões

Não houve diferença na composição lipídica dos embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos maturados em meio convencional ou em meio suplementado com PL (Figuras 9 e 10). É possível observar dois picos de maior intensidade nos espectros coletados de embriões produzidos *in vitro* representados por duas espécies de fosfatidilcolinas (761 e 787 – vide tabela 3).

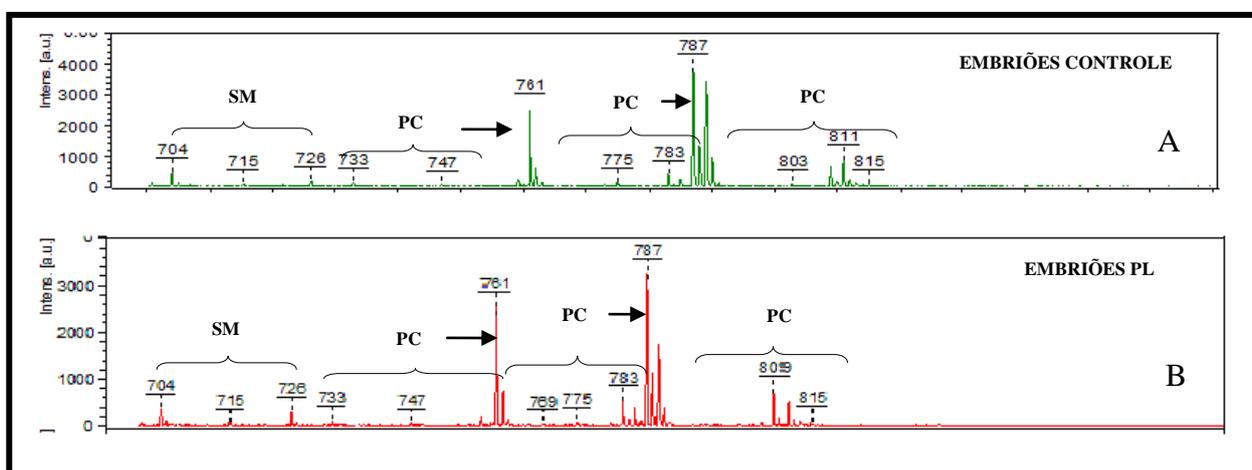


Figura 9. Espectros de massas contendo o perfil lipídico dos embriões produzidos *in vitro*, oriundos de oócitos maturados em TCM controle ou TCM + PL. Os espectros foram obtidos por MALDI-TOF MS com matriz DHB em modo positivo de ionização. (A) Embriões do grupo TCM controle, (B) Embriões do grupo TCM suplementado com PL.

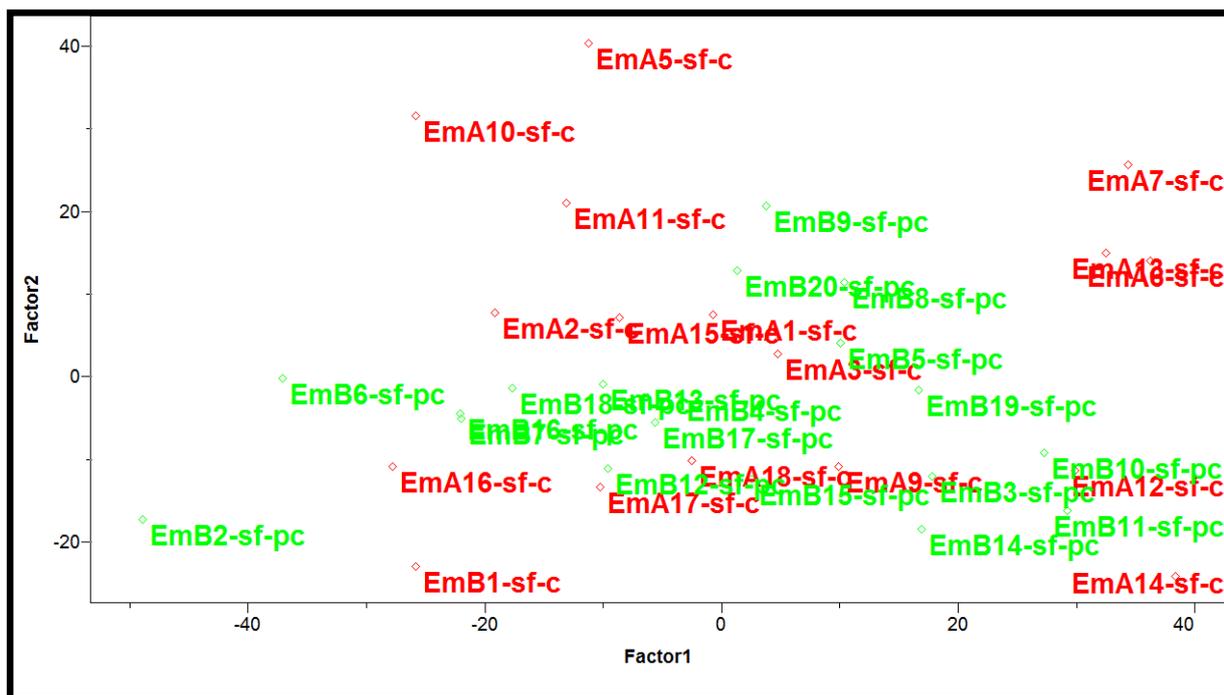


Figura 10. Comparação por PCA dos embriões resultantes de oócitos maturados *in vitro* em meio TCM controle (íons identificados em vermelho) ou TCM + PL (íons identificados em verde).

5.4. Perfil lipídico dos complexos cumulus oophorus (CCOs) e de oócitos desnudos maturados *in vitro* em meio suplementado com PL.

Os resultados da análise por PCA indicam que não houve diferença entre os espectros de massa obtidos dos CCOs maturados em meio convencional e aqueles maturados em meio suplementado com PL (figuras 11A e B, e 12A). Ao analisarmos os oócitos maturados após desnudamento total em ambos os meios verificamos que também não houve diferença entre eles (figuras 11C e D, e 12B).

Em contrapartida ao compararmos o perfil lipídico dos oócitos desnudos com os CCOs maturados tanto em meio convencional como no suplementado com PL verificamos uma diferença entre eles, independente de haver ou não suplementação do meio com PL (Figuras 12 e 13).

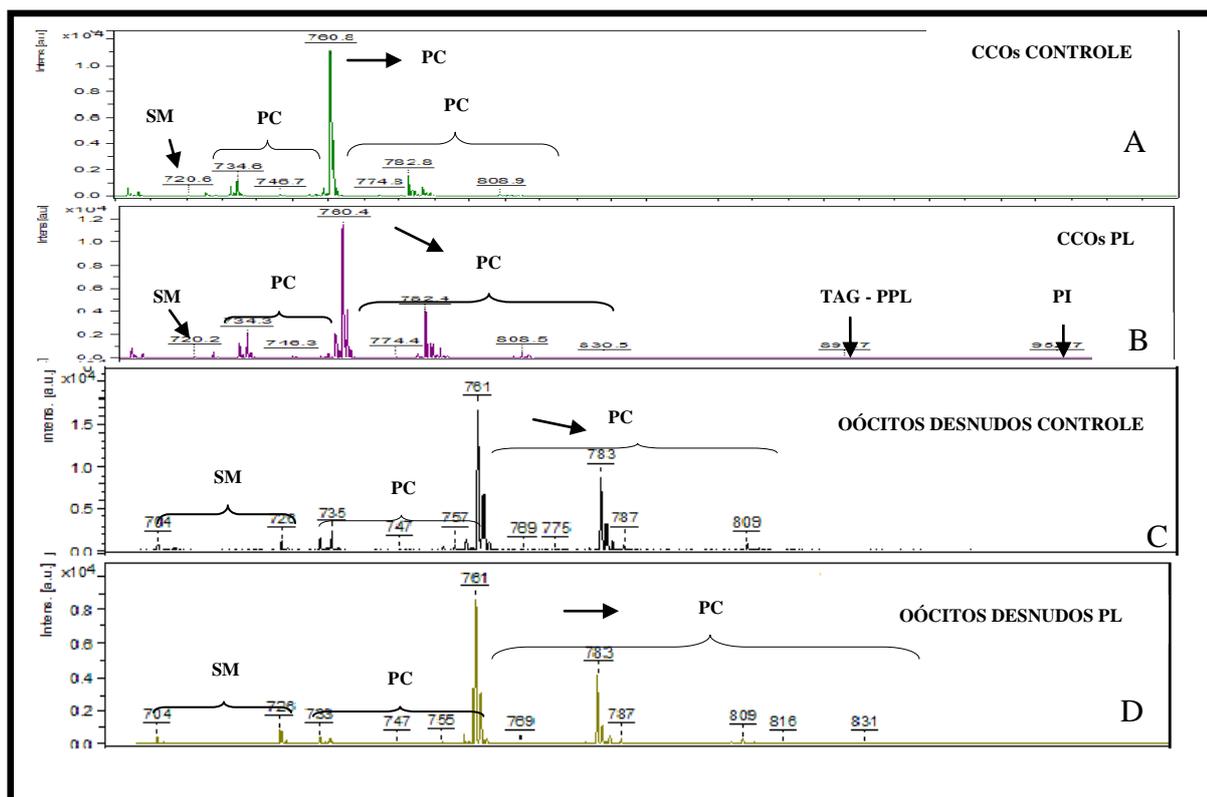


Figura 11. Espectros de massas contendo o perfil lipídico dos CCOs maturados em TCM controle (A), ou TCM + PL (B); e perfil lipídico de oócitos maturados desnudos (OD) em TCM controle (C) ou TCM + PL (D). Os espectros foram obtidos por MALDI-TOF MS com matriz DHB em modo positivo de ionização.

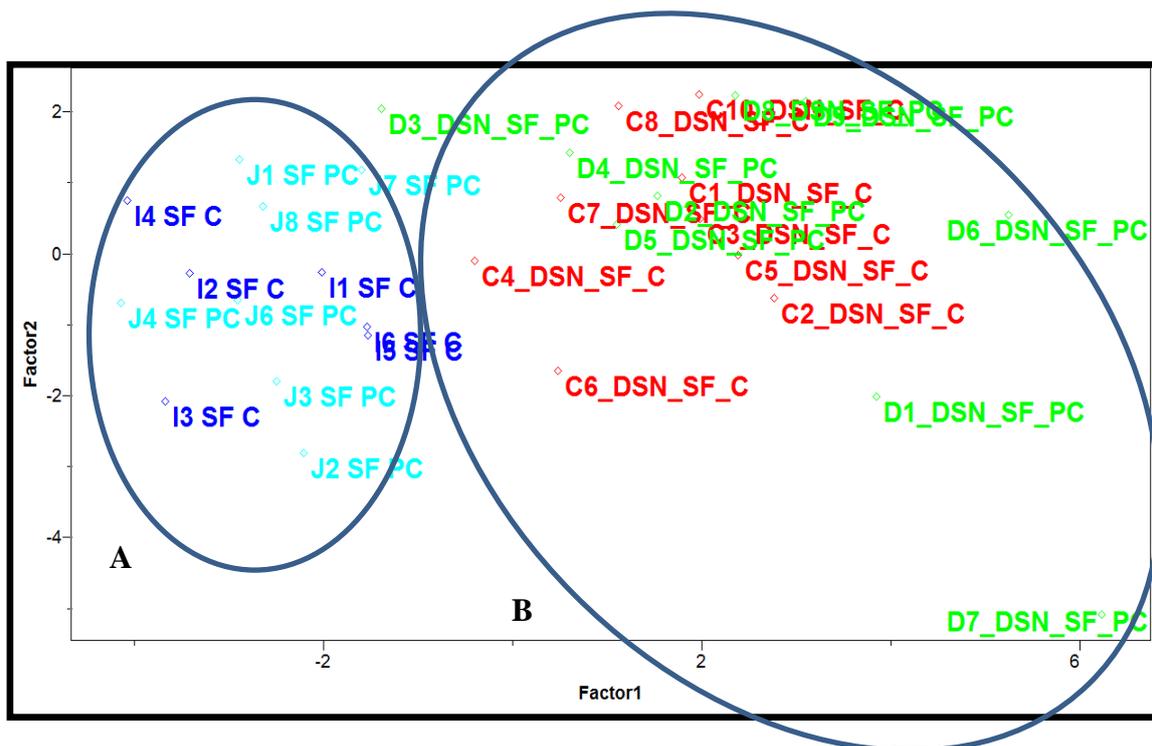


Figura 12. Comparação por PCA dos oócitos maturados com as células do cumulus (CCOs) dos grupos controle e suplementado com PL (A). PCA dos oócitos maturados desnudos (OD) dos grupos controle e suplementado com PL (B). Observa-se a separação dos íons entre os grupos de oócitos desnudos (identificados em vermelho e verde) e os complexos *cumulus oophorus* (identificados em azul claro e azul escuro), indicando a diferença entre estes grupos.

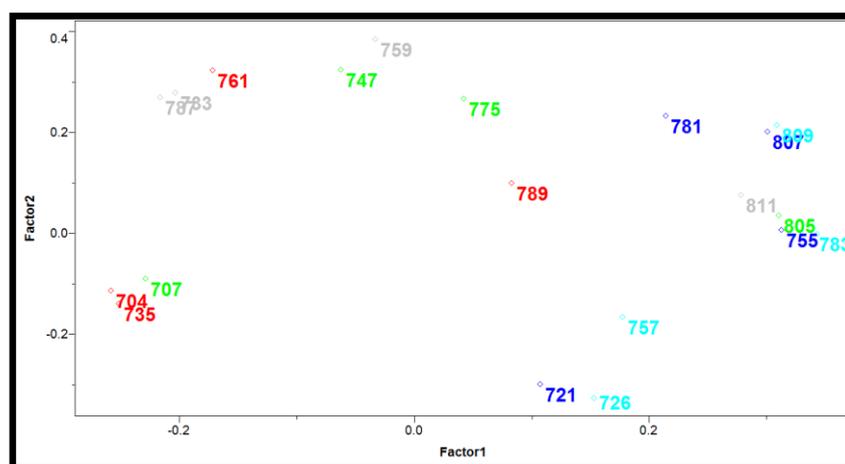


Figura 13. Comparação por PCA dos CCOs e oócitos desnudos maturados *in vitro* em meio TCM controle ou TCM + PL. Observam-se os íons responsáveis pela separação dos grupos CCO (identificados em azul claro e azul escuro) e oócitos desnudos (verde e vermelho). Íons comuns aos dois grupos são identificados na cor cinza.

5.5. Identificação dos principais íons obtidos com os espectros de massas

A análise mais detalhada da composição lipídica dos oócitos por PCA identificou os íons responsáveis pela separação destes 2 grupos (tabela 4). Nos oócitos maturados com as células do cumulus (CCOs) observa-se predominância de espécies de fosfatidilcolinas poliinsaturadas enquanto nos oócitos maturados na ausência das células do cumulus predominam fosfatidilcolinas contendo AGs saturados ou monoinsaturados.

Tabela 3. Valores de m/z dos lipídios observados nos oócitos (grupo CCO ou OD), embriões e meio TCM199.

m/z	TCM	TCM PL	CCO controle	CCO PL	OD controle	OD PL	Embrião controle	Embrião PL
704								X
726			X	X	X	X		
735			X	X	X			
757					X			
761			X	X	X	X	X	X
783			X	X	X	X	X	X
787					X		X	X
789					X			
809					X		X	X
811								X

Tabela 4. Espécies de fosfatidilcolinas (PC) e esfingomielinas (SM) indicadas por PCA nos grupos de oócitos maturados maturados *in vitro* (CCO ou OD).

m/z	CCOs	Oócitos desnudos	Composto
704		X	[SM (16:0) + H] +
707		X	[PC (30:0) + H] +
721	X		[PC (32:0) + H] +
726	X		[SM (16:0) + Na] +
735		X	[PC(32:0) + H] +
747		X	PC (34:0) + H] +, PC (34:1) + H] +
755	X		[PC (32:1) + Na] +
757	X		[PC (32:0) + Na] +
761		X	[PC (34:1) + H] +
775		X	[PC (36:0) + H] +, [PC (36:0) + H]
781	X		[PC (34:2) + Na] +, [PC (36:5) + H] +
783	X		[PC (36:4) + H] +, [PC (34:1) + Na] +
789		X	[PC (36:1) + H] +
805		X	[PC (38:7) + H] +, [PC36:4 + Na] +
807	X		[PC (38:6) + H] +, [PC36:3 + Na] +
809	X		[PC (38:5) + H] +, [PC (36:2) + Na] +

6. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que a análise isolada dos diferentes meios utilizados na MIV dos oócitos, utilizando a técnica de MS permitiu claramente a identificação da composição lipídica característica de cada meio. Os espectros de massas permitem a caracterização do PL acrescido ao TCM, sendo esta a principal diferença entre os meios TCM convencional e TCM suplementado com PL, comprovando a fidedignidade do método em identificar espécies moleculares entre diferentes substâncias ou estruturas analisadas. A técnica de MALDI-MS tem uma alta sensibilidade (CEGLAREK et al., 2002), sendo atualmente utilizada em vários campos da ciência. Inclusive estudos sobre o perfil dos meios usados na PIV de embriões bovinos tem apontado a autenticidade da técnica (FERREIRA et al., 2009).

A MS é capaz de quantificar e caracterizar uma grande variedade de elementos, moléculas e biomoléculas presentes em formas puras ou misturas complexas (KARAS; HILLENKAMP, 1988). Neste estudo verificamos que o PL adicionado ao meio de MIV, com grau de pureza de aproximadamente 99%, representa uma combinação de várias espécies de fosfocolinas, indicadas por diferentes picos de intensidade do íon podendo ser caracterizado como uma mistura complexa.

A literatura tem apresentado diversos estudos apontando benefício da suplementação dos meios de CIV com lipídios. PEREIRA et al. (2004) mostraram que a adição de ácido linoleico conjugado (CLA) em meio de CIV de embriões bovinos possui efeito positivo no aumento das taxas de sobrevivência embrionária pós-criopreservação (PEREIRA et al., 2004). Essa resistência dos embriões ao congelamento pode estar relacionada a estratégias que reduzem o teor de lipídios intracelular, ou ainda alteram o perfil lipídico do oócito ou embrião por meio do

aumento de ácidos graxos insaturados no citoplasma e membranas celulares, que favorecem o processo de congelamento devido as suas propriedades químicas e físicas, (HOCHI et al., 1996).

Pereira et al. (em 2008) mostraram que o aumento da sobrevivência dos blastocistos cultivados com t10, c12 CLA parece estar relacionado a uma redução no acúmulo de lipídios como confirmado pela observação de embriões sob um microscópio de contraste diferencial Nomarski (PEREIRA et al., 2008). Outro estudo, utilizando o mesmo isômero (t10, c12 CLA) também evidenciou que este é capaz de exercer um efeito inibitório na captação e na produção de lipídios pelas células (PARK et al., 1997; BROWN et al., 2001).

Apesar destes resultados com o acréscimo de lipídios no meio de cultivo embrionário, poucos são os relatos de suplementação no meio de maturação de oócitos *in vitro*. Considerando-se que já existem evidências de que o acréscimo de ácidos graxos no meio de cultivo embrionário melhora a taxa de produção e qualidade dos mesmos, propusemos que o acréscimo de PL no meio de MIV dos oócitos também pudesse ter impactos significativos sobre a produção de embriões, além de melhorar a taxa de sobrevivência de oócitos criopreservados. Porém, não foi encontrada diferença nas taxas de produção de embriões quando foi acrescido o PL no meio de maturação. Embora este dado não nos possibilite verificar o efeito direto sobre a composição das membranas e outras estruturas embrionárias de fato, não há impacto clínico relevante com esta suplementação na dose utilizada.

É sabido que determinadas substâncias, tais como os esteróides, migram para o óleo mineral durante o cultivo (VIREQUE et al., 2009), sendo assim uma das justificativas aventadas para explicar o não efeito dos PLs sobre as células cultivadas foi possibilidade de migração do PL para o óleo mineral utilizado para proteção do cultivo,

o que reduziria a incorporação do mesmo pelo oócito. Entretanto, o fosfolipídio utilizado neste estudo tem propriedades anfipáticas, ou seja, é uma molécula que apresenta características hidrofílicas e hidrofóbicas, o que dificulta que ocorra esta migração.

Além disso, não podemos esquecer que o PL foi acrescido somente ao meio de maturação oocitário e não ao de cultivo embrionário, ou seja, a exposição ao PL foi de apenas 24 horas, enquanto no cultivo embrionário esta exposição é mais prolongada, com duração de até 10 dias. Talvez, não tenha havido tempo de exposição suficiente para a incorporação de lipídios ao oócito ou pelo menos não o suficiente para afetar a constituição lipídica de membranas e de outras estruturas. Devemos ressaltar que durante a maturação oocitária, o metabolismo está direcionado para maturação nuclear e citoplasmática, e a atividade de síntese não está muito ativada. É preciso considerar também que a concentração utilizada de 10 μM pode ter sido insuficiente para a incorporação pelos oócitos. A primeira evidência de benefício com a suplementação do meio de maturação de oócitos com ácidos graxos utilizou o t10, c12 CLA (LAPA et al., 2011), um AG conjugado com albumina, onde os autores obtiveram melhora na competência citoplasmática de oócitos bovinos maturados com o meio suplementado, aumentando a taxa de formação blastocisto com morfologia adequada.

Também vale ressaltar que, embora inferior às taxas da produção *in vivo*, a taxa de produção de embriões *in vitro* já é satisfatória em meios convencionais e, por isso talvez não tenhamos encontrado impacto significativo da suplementação no meio de maturação oocitária.

Apesar de não verificarmos aumento na produção de embriões *in vitro* optamos por analisar de forma mais detalhada a característica dos embriões obtidos nos dois meios de maturação oocitária em termos de composição bioquímica referente aos

componentes lipídicos, podendo assim verificar se houve um aumento de ácidos graxos insaturados na sua composição, o que poderia melhorar a criotolerância. Sabemos que o soro, presente no meio de cultivo convencional de embriões, não só aumenta as concentrações lipídicas (conteúdo lipídico total) como também promove mudanças na sua composição (SATA et al., 1999; REIS, et al., 2003; CHARPIGNY et al., 2003). Porém, neste estudo, também não houve diferença entre os grupos nesta avaliação, sugerindo que o acréscimo dos PL no meio de MIV não produziu impacto sobre a composição lipídica do embrião. Talvez, o soro presente nos meios de maturação e cultivo, pode ter neutralizado, ou seja, pode ter anulado o efeito do fosfolipídio, devido à sua capacidade de alterar as composições lipídicas dos oócitos e embriões ou a dose de PL utilizada não foi efetiva.

Sabe-se que durante a maturação oocitária, a fertilização e a primeira clivagem há grande demanda energética por parte das células promovendo um consumo de gotículas lipídicas, isso justificaria a ausência de diferença entre os dois grupos, pois pode ter havido um consumo do PL durante as primeiras etapas do desenvolvimento embrionário, não podendo ser identificada a incorporação do PL avaliada no D10 de cultivo (FERGUSON; LEESE, 1999). Com estas considerações optamos por analisar o perfil lipídico dos oócitos maturados na presença ou ausência de PL.

Inicialmente realizamos esta análise em relação aos (CCOs), maturados em meio contendo ou não PL, e verificamos que não houve diferença entre os grupos. Este dado permite supor duas hipóteses: a primeira de que a não incorporação desses PL pode acontecer por um mecanismo de auto-regulação baseada na demanda, ou seja, a célula só irá incorporar o que realmente necessita e a segunda de que haveria um efeito de barreira produzido pela granulosa do *cumulus* que impediria a entrada deste PL no oócito.

As membranas são seletivamente permeáveis, enquanto elas retêm certos compostos e íons dentro das células, e de compartimentos específicos, excluem outros, mantendo assim sua concentração celular. Com base nisso, as células só incorporam o que realmente necessitam, e liberam para seu ambiente os subprodutos do seu metabolismo (LEHNINGER et al., 2002). Além disso, as membranas estabelecem uma barreira entre o meio externo e interno, permitindo ao interno, apresentar uma constituição própria, protegendo assim o conteúdo celular (LEHNINGER et al., 2002). Ou seja, pelos dados obtidos neste terceiro experimento não poderíamos apontar preferencialmente para nenhuma das duas hipóteses especificamente, por isso com o objetivo de avaliar o efeito de barreira produzido pelas células granulosa do *cumulus* estudamos o oócito desnudo, ou seja, maturados sem as células do *cumulus oophorus*, em ambos os meios, suplementado ou não com PL.

Verificamos que comparando o grupo de oócitos maturados com o CCO em relação ao grupo de oócitos desnudos, há uma diferença no perfil lipídico entre oócitos maturados no mesmo meio (suplementado com PL ou convencional), o que talvez possa sugerir que as células do *cumulus* modulam o perfil lipídico dos oócitos, embora não necessariamente funcionando como barreira, mas sim regulando mecanismos internos relativos a eventos do metabolismo (TANGHE et al., 2002). De fato, as células do *cumulus* de oócitos bovinos controlam o aporte de lipídios, como o ácido linoleico, do fluido folicular para o oócito, participando do mecanismo inibitório de retomada da meiose *in vivo* (HOMA; BROWN, 1992).

As células do *cumulus* se comunicam com o oócito por meio de uma rede extensiva de canais transmembrana conhecidos como *junções gap*, onde essas *junções gap* fornecem suporte nutricional, transmitindo íons e transportando moléculas mensageiras das células foliculares ao oócito (ANCIOTO et al., 2004). A comunicação

intercelular entre oócitos e células do *cumulus* na fase de vesícula germinativa é essencial para a maturação adequada dos oócitos, que é crucial para a fertilização e desenvolvimento embrionário posterior (EPPIG, 1991; GRAZUL-BILSKA et al., 1997). Sendo assim, a integridade do CCO exerce importante papel na regulação da maturação e controle metabólico do oócito sendo que a retirada das células do *cumulus* reduz significativamente o desenvolvimento embrionário subsequente (ZHANG et al., 1995; SHIOYA et al., 1998). Vale ressaltar, que na análise do perfil lipídico dos oócitos maturados desnudos, verificamos que predominam os lipídios saturados ou monoinsaturados, que estão relacionados com menor fluidez de membrana (LEHNINGER et al., 2002), enquanto que nos CCOs predominam os lipídios poliinsaturados, os quais estão relacionados com maior fluidez de membrana. Membranas metabolicamente mais ativas devem conter maior concentração de AG insaturados, o que lhes confere maior fluidez, esta característica é identificada nos embriões em estágios mais avançados do seu desenvolvimento. Talvez, ocorra a incorporação ou a produção mais precoce destas espécies monoinsaturadas na ausência das células do *cumulus*, ao passo que a integridade dos CCOs ao longo das fases iniciais de cultivo permite que o aporte de substâncias para o oócito seja feito através das *junções gap*, com aporte predominante de AG poliinsaturados.

No sentido de compreender a importância da integridade dos CCOs, cultivamos oócitos desnudos em meio convencional e em meio suplementados com PL e não encontramos diferença entre os dois grupos cultivados em relação ao perfil lipídico. Isso sugere que, com ou sem as células do *cumulus* as composições lipídicas do oócito não são incrementadas por PL, talvez outros lipídios presentes no meio de cultivo possam ter sido responsáveis por estas outras diferenças encontradas. Aqui destaca-se novamente a possibilidade de um papel modulador das células do *cumulus* sobre o

influxo de substâncias lipídicas para dentro do oócito. Os benefícios da presença dessas células durante a MIV podem ser atribuídos à formação de um microambiente favorável (bioquímico e metabólico) ao redor do oócito (SUTTON et al., 2003). O efeito de célula – célula na sinalização entre os oócitos e células da granulosa durante as primeiras fases da foliculogênese sobre o metabolismo do oócito é desconhecida, o que demanda estudos futuros. Ressaltamos como uma justificativa bastante interessante neste contexto, a hipótese da auto-regulação baseada na demanda, onde independente da presença ou não do *cumulus* a incorporação de substâncias pode ser regulada de forma ativa, na dependência da necessidade celular.

Considerando também um outro contexto onde a fluidez da membrana também parece ser significativa, a criotolerância em situações de criopreservação de gametas e embriões, vem sendo correlacionada com estas propriedades físicas da membrana, onde a maior fluidez promove melhores resultados de sobrevivência e manutenção de qualidade oocitária (HORVATH; SEIDEL, 2006). Talvez a suplementação dos meios de criopreservação com fosfolipídios possa reduzir os efeitos negativos do congelamento sobre estas células, aumentando a criotolerância através da interferência nestas características estruturais de membrana. Estudos que avaliam este potencial dos PLs estão sendo desenhados por nosso grupo no sentido de otimizar os protocolos de criopreservação de oócitos.

7. CONCLUSÕES

A suplementação do meio de maturação de oócitos bovinos com PL na concentração de 10 μ M não influenciou o conteúdo lipídico dos oócitos maturados e não promoveu melhora na produção *in vitro* e na qualidade embrionária.

As células do *cumulus* influenciam o perfil lipídico dos oócitos maturados *in vitro*, havendo predomínio de PLs poliinsaturados no oócito na presença destas células.

8. REFERÊNCIAS

- ABE, H et al. Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. **Anat Embryol**, v. 199 p519-527. 1999
- ABE, H et al. Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. **Mol Reprod Dev**, v.53, p.325-335. 1999.
- ABE, H et al. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Mol Reprod Dev**, v.61, p.57-66. 2002.
- ANCIOTO, KL et al. Influência das células do cumulus e do meio de maturação in vitro de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da competência do desenvolvimento embrionário. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.118. 2004
- BROWN, JM et al. Trans-10, cis-12, but not cis-9, trans-11, conjugated linoleic acid attenuates lipogenesis in primary cultures of stromal vascular cells from human adipose tissue. **J Nutr**, v.131, p.2316-2321. 2001
- BULGARELLI, D. L. A vitrificação de oócitos bovinos prejudica sua capacidade reprodutiva, independente do estadio de maturação. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Área de concentração: Biologia da Reprodução, 2011.
- CEGLAREK, U et al. Validation of the phenylalanine/tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry: sensitive newborn screening for phenylketonuria. **Clin Chem Lab Med** 2002. 40:693-697.
- CETICA, P et al. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation *in vitro*. **Reproduction**, v.124, p.675-681. 2002.
- CHA, KY; CHIAN, RC. Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. **Hum Reprod**, v.4, p.103-120. 1998.
- CHAKRABARTY, J et al. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. **Cryobiology**, v.54, p.27-35. 2007.
- CHARPIGNY, G et al. Fatty acid composition of tryglicerides, phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines of bovine embryos. **Les Actes du BRG**, v.4, p.159–172. 2003.
- CHIAN, RC et al. Live birth after vitrification of in vitro matured human Oocytes. **Fertil Steril**, v.91, p.372-376. 2009.
- CHOI, YH et al. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. **Theriogenology**, v.56, p.661–670. 2001.

CROSIER, AE et al. Ultrastructural morphometry of bovine compact morula e produced *in vivo* or *in vitro*. **Biol Reprod**, v.62, p.1459–1365. 2000.

CUMMINS, JM. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Domest Anim**, v.115, p.23-29. 2004.

DAVIS, VJ. Female gamete preservation. **Cancer**, v.107, p.1690-1694. 2006.

DE PABLO et al. Immune cell functions, lipids and host natural resistance. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.29, p.323-328. 2000.

DINNYES, A; NEDAMBALE, TL. Cryopreservation of manipulated embryos: tackling the double jeopardy. **Reprod Fertil Dev**, v. 21, p.45 – 59. 2009.

DONNEZ, J et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. **Hum Reprod Update**, v.12, p.519-535. 2006.

EJSING, CS et al. Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.106, p.2136 – 2141. 2009.

EPPIG, JJ. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. **Bioessays**, v.13, p.569-574. 1991.

ETHICS COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY OF REPRODUCTIVE MEDICINE. Fertility preservation and reproduction in cancer patients. **Fertil Steril**, v.83, p.1622–1628. 2005.

FENG, X et al. Mass spectrometry in systems biology: an overview. **Mass Spectrom Rev**, v.27, p.635-660. 20008.

FERGUSON, EM; LEESE HJ. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. **J Reprod Fertil**, v.116, p.373-378. 1999.

FERREIRA, CR et al. Mass spectrometry fingerprinting of media used for *in vitro* production of bovine embryos. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v.23, p.1313–1320. 2009.

FERREIRA, CR et al. Princípios e aplicações da espectrometria de massas em produção animal. Anais do II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal – 22 e 23 de junho de 2009 Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos – SP – Brasil.

FUCHS, B; SCHILLER, J. MALDI-TOF MS analysis of lipids from cells, tissues and body fluids. **Subcell Biochem**, v.49, p.541-565. 2008.

GIDONI, Y et al. Fertility preservation in patients with non-oncological conditions. **Reprod Biomed Online**, v.16, p.792–800. 2008.

GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. London: Cambridge University Press; 1994.

GRAZUL-BILSKA, AT; REYNOLDS, LP; REDMER, DA. Gap junctions in the ovaries. **Biol Reprod**, v.57, p.947-57. 1997.

GROSS, JH. Mass spectrometry: a textbook. Heidelberg, Germany: Springer Verlag, p.518. 2004.

HOMA, ST; BROWN, CA. Changes in linoleic acid during follicular development and inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in cumulus-free bovine oocytes. **J Reprod Fertil**, v.94, p.153-60. 1992.

HOCHI, S; SEMPLE, E; LEIBO, SP. Effect of cooling and warming rates during cryopreservation on survival of in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.46, p.837-47. 1996.

HOFFMANN, E; STROOTBART, V. Mass spectrometry: principles and applications. 3. Ed. West Sussex, England: Wiley-Interscience, p.502. 2007.

HORVATH, G; SEIDEL JÚNIOR, GE. Vitrification of bovine oocytes in chemically defined media after treatment with cholesterol-loaded methyl- β -cyclodextrin. **Theriogenology**, v.664, p.1026-33. 2006.

JEFFERY, NM et al. The ratio of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat diet alters serum lipid levels and lymphocyte functions. **Lipids**, v.31, p.737-745. 1996.

KARAS, M; HILLENKAMP F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Anal Chem**, v.60, p.2299 – 2301. 1988.

KIM, JY et al. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. **Reproduction**, v., p.22:131-138. 2001.

KUNDU, CN et al. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. **Cryobiology**; v.40, p.117-125. 2000.

LAPA, M et al. Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on bovine oocyte competence and fatty acid composition. **Reprod Domest Anim**, v.46, p.904-10. 2011

LEE, AG. Functional properties of biological membranes: a physical-chemical approach. **Prog Biophys Mol Biol**, v.29, p.3-56. 1975.

LEE, SJ et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. **J Clin Oncol**, v.24, p.2917–31. 2006.

LEHNINGER, AL; NELSON, DL; COX, MM. Princípios de Bioquímica. 3.ed. São Paulo: Sarvier, p.280-300. 2002.

LEHNINGER, AL; NELSON, DL; COX, MM. Princípios de Bioquímica. 3.ed. São Paulo: Sarvier, p.301-339. 2002.

LEROY, JL et al. The effect of nutritionally induced hyperlipidaemia on *in vitro* bovine embryo quality. **Hum Reprod** v.25, p.768-778. 2010.

LIN, YH; HWANG, JL. *In vitro* maturation of human oocytes. **Taiwan J Obstet Gynecol**, v.45, p.95-99. 2006.

MASSIP, A. Cryopreservation of bovine oocytes: current status and recent developments. **Reprod Nutr Dev**, v.43, p.325-30. 2003.

MARHHOM, E; COHEN I. Fertility preservation options for women with malignancies. **Obstet Gynecol Surv**, v.62, p.58-72. 2006.

MCEVOY, TG et al. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. **J Reprod Fertil**, v.118, p.163-170. 2000.

PARK, Y et al. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. **Lipids**, v.32, p.853-8. 1997.

PARMEGIANI, L et al. Freezing within 2 h from oocyte retrieval increases the efficiency of human oocyte cryopreservation when using a slow freezing/ rapid thawing protocol with high sucrose concentration. **Hum Reprod**, v. 23, p.1771–1777. 2008.

PARRISH, JJ et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biol Reprod**, v.38, p.1171–80. 1988.

PEREIRA, RM et al. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. **Anim Reprod Sci**, v.106, p.322-32. 2008.

PEREIRA, RM et al. “Postthawing resistance of bovine embryos is improved by *trans-10, cis-12* conjugated linoleic acid (CLA).” In: Proceedings of 15th International Congress on Animal Reproduction (ICAR), vol. 2, Porto Seguro, Brazil, August 8th–12th, p. 538, 2004.

PLANTE, L; KING, WA. Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by in vitro and in vivo fertilization. **J Assist Reprod Genet**, v.11, p.515-29. 1994.

PORCU, E et al. Healthy twins delivered after oocyte cryopreservation and bilateral ovariectomy for ovarian cancer. **Reprod Biomed Online**, v.17, p.265–267. 2008.

REIS, A et al. Stress-associated developmental arrest following *in vitro* ovine embryo culture in the presence of docosahexaenoic acid (DHA). **Reproduction**, v.30, p.48. 2003 (Abstract).

REVEL, A; LAUFER N. Protecting female fertility from cancer therapy. **Mol Cell Endocrinol**, v.187, p.83-91. 2002.

RICKER, JV et al. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. **Biol Reprod** v.74, p.359-365. 2006.

ROBERTS, LD et al. A matter of fat: an introduction to lipidomic profiling methods. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v.871, p.174 – 181. 2008.

ROSENKRANS JÚNIOR, CF; FIRST NL. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. **J Anim Sci**, v.72, p.434–437. 1994.

SAEKI, K et al. Early morphological events of *in vitro* fertilized bovine oocytes with frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, v.35, p.1051-1059. 1991.

SATA, R et al. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serumcontaining medium during early embryonic development. **J Reprod Dev**, v.45, p. 97–103. 1999.

SHAMSUDDIN, M; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Fine structure of bovine blastocysts developed either in serum-free medium or in conventional co-culture with oviduct epithelial cells. **Zentralbl Veterinarmed A**, v.41, p.307-316. 1994.

SHAW, JM; ORANRATNACHAI, A; TROUNON, AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v.53, p.59-72. 2000.

SHIOYA, Y et al. *In vitro* fertilization and cleavage capability of follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. **Theriogenology**, v.30, p.489-489. 1998.

SIRARD, MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v.55, p.1241-54. 2001.

SPECTOR, AA. “Fatty acid, glyceride and phospholipid metabolism.” In: Growth, Nutrition and Metabolism of Cells in Culture pp 257–296 Eds GH Rothblat and VJ Cristofalo. Academic Press, New York. 1972

STUBBS, CD; SMITH, AD. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochim Biophys Acta**, v.779, p.89-137. 1984.

STURMEY, RG et al. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reprod Dom Anim**, v.44, p.50–58. 2009.

SUTTON, ML et al.. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. **Reproduction**, v.126, p.27-34. 2003.

TANGHE, S et al. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Mol Reprod Dev**, v.61, p.414-424. 2002.

Tao, T; Del Valle, A. Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application. **J Assist Reprod Genet**, v.25, p.287-296. 2008.

TUCKER, MJ et al. Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent *in vitro* maturation. **Fertil Steril**, v.70, p.578-579. 1998.

VAN BRRAMER, S E. An introduction to mass spectrometry. Widener University, Chester PA, 1998.

VAJTA, G; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology** v.65, p.236-244. 2006.

VIREQUE, AA et al. Effects of washed and autoclaved mineral oil overlay used during IVM of bovine oocytes on steroid concentration and preimplantational embryo development. **JBRA Assist Reprod**, v.15, p.26-29. 2011.

VIREQUE, AA et al. Preimplantation development and expression of Hsp-70 and Bax genes in bovine blastocysts derived from oocytes matured in alpha-MEM supplemented with growth factors and synthetic macromolecules. **Theriogenology**, v.71, p.620-627. 2009.

WATSON, PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod Fertil Dev**, v.7, p.871-891. 1995.

WATSON, PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim Reprod Sci**, v.60-61, p.481-492. 2000.

WATSON, AD. Thematic review series: systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. **J Lipid Res**, v.47, p.2101-2111. 2006.

WILDING, M et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. **Hum Reprod**, v.16, p.909-917. 2001.

YANG, D et al. Live birth after the transfer of human embryos developed from cryopreserved oocytes harvested before cancer treatment. **Fertil Steril**, v.87, p.1469.e1-4. 2007.

YOUNGS, CR; CHRISTENSON, LK; FORD, SP. Investigations into the control of litter size in swine: III. A reciprocal embryo transfer study of early conceptus development. **J Anim Sci**, v.72, p.725-31. 1994.

ZHANG, L et al. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro*. **Mol Reprod Devel**, v.40, p.338-344. 1995.

ANEXO A

O PCA (análise dos componentes principais) é um método que tem por finalidade básica, a análise dos dados usados visando sua redução, eliminação de sobreposições e a escolha das formas mais representativas de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais. É um dos métodos estatísticos de múltiplas variáveis mais simples, sendo considerado uma técnica de transformação linear ótima, dentre as transformadas de imagens, sendo muito utilizada pela comunidade de reconhecimento de padrões. É também uma maneira de identificar a relação entre características extraídas de dados. É bastante útil quando os vetores de características têm muitas dimensões, quando uma representação gráfica não é possível, mas também pode ser útil em dimensões menores.

MANUSCRITO

**LIPID PROFILE OF BOVINE OOCYTES MATURED IN MEDIUM SUPPLEMENTED
WITH PHOSPHOLIPID: NEW STRATEGIES TO MODULATE OOCYTE
CRYOTOLERANCE**

A ser submetido para publicação: **Reproduction**

1 **Lipid profile of bovine oocytes matured in medium supplemented with**
2 **phospholipid: new strategies to modulate oocyte cryotolerance**

3
4 ^aPitangui CP; ^aVireque AA, ^bTata A, ^bSantos VG, ^bFerreira CR, ^bEberlin, MN; ^aSá
5 MFS, ^aRosa e Silva ACJS
6
7
8

9 ^aDepartment of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine of Ribeirão Preto,
10 University of São Paulo 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil.

11 ^bThoMSon Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, University of
12 Campinas 13083-970, Campinas, SP, Brazil.
13
14
15

16 Running title: Lipid profile in IVM oocytes by MALDI-MS
17
18
19
20
21
22
23

24 Corresponding author. ^aDepartment of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine
25 of Ribeirão Preto, University of São Paulo 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil.

26 Tel. +55 16 3602 2817; fax: +55 16 3602 2231. *E-mail address:* anasars@fmrp.usp.br
27

28 **Abstract**

29

30 The literature has presented evidences that lipid supplementation of the embryo culture
31 media exerts positive effects on embryogenesis and cryotolerance. The success of
32 oocyte *in vitro* maturation (IVM) and cryopreservation protocols would provide a
33 potential strategy to preserve fertility in cancer patients. The objectives of this study
34 were to compare lipid profiles of oocytes matured *in vitro* in the presence or absence of
35 PL and relate this information to lipid profile and preimplantational development of
36 IVM-derived embryos. Also, we evaluated the lipid profiles of maturation media using
37 bovine oocytes as an experimental model. COCs were matured in TCM or TCM + PL,
38 both containing 10% fetal calf serum, 0,5µg/ml FSH, 5 µg/mL LH, and 1 µg/mL 17β-
39 estradiol, with 5% CO₂ for 24 h. After IVM, oocytes were mechanically denuded,
40 washed in PBS and stored at -80°C until lipid analysis. Oocytes, maturation media and
41 blastocysts were submitted to the MALDI-MS (matrix-assisted laser
42 desorption/ionization mass spectrometry). Differences in lipid profile were addressed by
43 principal component analysis. Maturation media lipid fingerprint by MALDI-MS allows
44 differentiation among TCM and TCM+PL. However, the MALDI-MS of the *in vitro*
45 matured oocytes demonstrated that lipid profile of control or PL-supplemented groups
46 were not different. Similarly, no differences were observed in the lipid profile and
47 embryogenesis of resulting embryos. Nevertheless, differences in lipid profiles between
48 COCs and denuded oocytes (DOs) matured *in vitro* were indicated to occur. The former
49 contain PC ions with higher degrees of unsaturation in the fatty acid residues, while
50 DOs contain PC ions with unsaturated (18:0) or monoenoic (18:1) fatty acids. The
51 MALDI-MS has allowed obtaining informative lipid profiles for culture media and
52 IVM-oocytes. Identification of lipid changes during IVM may contribute to determine

53 appropriate lipid supplementation of IVM/vitrification media and to improve
54 cryopreservation of human oocytes.

55

56

57 *Keywords:* oocyte; *in vitro* maturation; phospholipid; lipid profile; mass spectrometry

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80 **1. Introduction**

81

82 Cryopreservation of oocytes, embryos and ovarian tissue has emerged as an important
83 technique used in human assisted reproductive technology (ART), especially for
84 patients in cancer treatment (Marhhomn and Cohen, 2006). Thus, the success of both
85 follicle/oocyte IVM and cryopreservation protocols would provide a potential strategy
86 to safeguard fertility in these patients.

87 Nowadays, few studies have been conducted in mammalian oocytes to characterizing
88 intracellular lipids and determining its role on oocyte maturation. Intracellular lipid
89 content varies greatly between porcine, ovine, bovine, murine and human oocytes
90 (MacEvoy *et al.* 2000; Genicot *et al.*, 2005; Loewenstein *et al.*, 1964). The total content
91 of triacylglycerols (TAGs) in immature bovine oocytes is 58-59 ng / oocyte (Ferguson
92 and Leese, 1999; Kim *et al.*, 2001), whereas in porcine oocytes is 135 ng / oocyte
93 (Sturmev and Leese, 2003). On the other hand, studies on the lipid profile demonstrated
94 that in pig, cattle and human oocytes, palmitic, stearic, oleic and linoleic acids are the
95 most abundant intracellular fatty acids (Homa *et al.*, 1986; Matorras *et al.*, 1998; Kim *et*
96 *al.*, 2001), with stearic acid more abundant and oleic acid less abundant in less-
97 competent oocytes (Matorras *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2001).

98 Oocyte and IVP-embryos fatty acid profiles have been proposed as a tool to predict
99 developmental competence and embryo quality. A reduction in the concentrations of
100 linoleic acid and oleic acid, both unsaturated fatty acyl residues, in human embryos was
101 correlated with failure to development beyond 4-cell stage, when compared to normal
102 development (Haggarty *et al.*, 2006). Similarly, Zeron *et al.* (2001) reported that the
103 seasonal changes in the bovine oocyte developmental competence might arise primarily
104 due to changes in fatty acids profiles of ovarian follicular fluid and oocytes. The role of

105 phospholipids (PL) on the oocyte competence and embryo development, however, is
106 poorly understood.

107 The cell membranes have been identified as the primary site of damage induced by
108 cryopreservation process (Arav *et al.*, 1996; Zeron *et al.*, 2001; Zeron *et al.*, 2002). In
109 animal cells, to keep the structure, fluidity and function of the membranes, unsaturated
110 fatty acids, which have double bonds in its molecule, are essential (Miles and Calder,
111 1998). One of the most important properties of the cell membrane lipid bilayer is the
112 relative mobility (fluidity) of the individual lipid molecules and how this mobility
113 changes with temperature. Briefly, at a given temperature a lipid bilayer of membranes
114 can exist in either a liquid or a solid (gel) phase. All lipids have a characteristic
115 temperature at which they undergo a transition from the gel to liquid phase. Saturated
116 phospholipids with tails longer than 14 carbons are solid at room temperature, while
117 those with fewer than 14 are liquid. Cells with more flexible membranes, therefore, will
118 usually have less membrane damage than those with more rigid membranes. In addition,
119 there will be less osmotic stress if permeabilities of cell membranes to water and
120 cryoprotectants are high. Such cellular properties are highly dependent on membrane
121 composition or cell lipid profile. So, high levels of intracellular lipids, especially those
122 rich in saturated fatty acids, can be a limiting factor in cryopreservation (Nagashima *et*
123 *al.*, 1994; Leibo and Loskutoff, 1993; Leibo *et al.*, 1995) and new strategies to identify
124 and modulate oocyte lipid profile can considerably contribute to better *in vitro*
125 maturation and cryopreservation protocols.

126 The oocyte is particularly sensitive to low temperatures (Leibo *et al.*, 1995) and this
127 susceptibility is strongly influenced by intracellular lipid composition, including higher
128 content of TAGs and lower content of PLs and cholesterol esters, which is well
129 described in *in vitro* produced embryos (Tominaga *et al.*, 2000, Pereira *et al.*, 2004). In

130 IVP-embryos, excess TAGs not only causes loss of viability, associated with delayed
131 development, but can also lead to altered gene expression and decreased cryotolerance
132 (Tominaga *et al.*, 2000; Guerin *et al.*, 2001; Abe *et al.*, 2002).

133 Understanding the functions of lipids and how they are involved in the processes of
134 growth and maturation of the oocyte and embryo development can contribute
135 significantly to the optimization of cryopreservation techniques and enable the
136 implementation of the freezing of oocytes in clinical practice. Thus, the objectives of
137 this study were investigating the lipid profile oocyte matured in PL-supplemented
138 medium and in resultant *in vitro* produced embryos by matrix-assisted laser
139 desorption/ionization mass spectrometry (MALDI MS), using bovine oocytes as an
140 experimental model. Additionally, we also analyzed the lipid profile of *in vitro*
141 maturation media to identify the exogenous added PL and to evaluate if lipid profile of
142 medium is modified after oocyte culture.

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156 **2. Methods**

157

158 *2.1. Reagents and culture media for in vitro embryo production*

159

160 All the chemicals used during the study were from Sigma Chemical CO (St. Louis, MO,
161 USA) unless otherwise stated.

162

163 *2.1.1. Culture media for in vitro maturation*

164

165 The basic maturation medium was HEPES-buffered tissue culture medium-199 (TCM-
166 199, Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal calf serum
167 (FCS, Invitrogen Gibco/BRL), 0.2 M sodium pyruvate, 100 IU/mL penicillin G, 100
168 µg/mL streptomycin, 0.5 µg/mL follicle stimulating hormone (FSH, Folltropin-
169 Bioniche, Canada), 5 µg/mL luteinizing hormone (LH, Lutropin-Bioniche, Canada) and
170 1 µg/mL 17β-estradiol.

171

172 *2.2. Collection and in vitro maturation of bovine oocytes*

173

174 The ovaries were collected at a slaughterhouse and transported to the laboratory in 0.9%
175 physiological saline supplemented with 0.05 g/L streptomycin at 33 to 37 °C. The
176 ovaries were washed in 0.9% physiological saline at 37 °C and follicles measuring 3 to
177 8 mm in diameter were aspirated with 21 G needles adapted to 20 mL syringes.
178 Cumulus-oocyte complexes recovered from the follicular fluid were washed in TALP-
179 HEPES medium (Gordon, 1994) and were evaluated morphologically under a
180 stereoscopic microscope, as previously described (Vireque *et al.*, 2009). Only oocytes

181 with homogeneous cytoplasm and with more than three layers of granulosa cells were
182 selected for the study.

183

184 2.2.1. *Experimental design*

185

186 The pool of immature COCs selected for IVM was randomly divided into two
187 experimental groups: 1) standard *in vitro* maturation medium (TCM-199-control group)
188 or 2) TCM-199 + 10 μ M PL (TCM-PL).

189 The two oocyte groups were cultured for 24 h in 35 mm Petri dishes covered with 3 mL
190 of M8410 mineral oil at 38.5° C, in atmosphere with 5% CO₂, for a period of 24 h. Each
191 experiment was carried out with five replicates and the COCs were cultured at a density
192 of 1/10 μ L culture medium. Media samples of IVM of bovine oocytes were also used to
193 acquire MALDI-MS fingerprints in the lipid profile experiments as following: (i) fresh
194 culture medium; (ii) fresh culture medium supplemented with PL, (iii) culture medium
195 after 24 h of IVM of oocytes, and (iv) culture medium supplemented with PL after 24 h
196 of IVM of oocytes. Experimental design aimed to characterize the lipid profile of media
197 before and after COCs culture and to identify the phospholipid added to *in vitro*
198 maturation medium. All *in vitro* maturation experiments were performed with at least
199 three replicates. After IVM, oocytes were mechanically denuded, washed in TALP
200 medium and stored in microtubes containing 2-4 μ L of PBS at -80°C overnight, until
201 lipid analysis.

202

203 2.3. *In vitro embryo production*

204

205 After maturation, oocytes were inseminated with thawed spermatozoa obtained by the

206 swim-up method (Parrish et al., 1998) using the Sperm TALP medium (Rosenkrans and
207 First, 1994) supplemented with 6 mg/mL BSA fraction V. Fertilization was performed
208 in 100 μ L drops of Fert TALP medium (Gordon, 1994) supplemented with 20 μ g/mL
209 heparin and 6 mg/mL fatty acid-free BSA under mineral oil. The concentration of
210 sperms during fertilization was approximately 1×10^6 /mL and the sperms were co-
211 incubated with COC for 18 h in a moist atmosphere containing 5% CO₂ at 38.5 °C.
212 After fertilization, the oocytes were partially denuded by pipetting in TALP medium
213 (Gordon, 1994) and the presumptive zygotes with up to 2-3 CC layers were cultured in
214 50 μ l drops of CR2aa medium (Rosenkrans and First, 1994) supplemented with 10%
215 fetal bovine serum (Invitrogen) and 1 mg/mL BSA under mineral oil, in a moist
216 atmosphere containing 5% CO₂ at 38.5 °C. The culture medium was changed every 48
217 h. The cleavage rate was determined 72 h post-insemination (hpi), the morula and
218 blastocyst rates at 168-192 hpi, and the hatching rates at 224 hpi. The cleavage and
219 blastocyst rates were calculated on the basis of the number of presumptive zygotes and
220 the hatching rates were calculated from the number of blastocysts. For *in vitro* embryo
221 production experiment nine replicates were performed. Hatched blastocysts (192 hpi)
222 were removed from the culture, washing in TALP medium and vitrified using Cryotop
223 method for posterior analysis of lipid profile.

224

225 2.4. *Lipid profile of culture medium, oocytes and embryos*

226

227 *Sample preparation*

228

229 Each sample of IVM media (2 μ L) was placed on a spot on the MALDI target plate and
230 allowed to dry at room temperature and recovered with 1 μ L of 1.0 M of 2,5-

231 dihydroxybenzoic acid (DHB) diluted in pure methanol just before analysis. Pools of 5
232 oocytes or individual IVP embryo, derived from IVM matured oocytes in TCM-199 in
233 the presence or absence of PL, were washed five times in drops of phosphate-buffered
234 saline solution (PBS) and stored in microtubes containing 2-4 μL of PBS at -80°C until
235 analysis, when samples were thawed by pipetting 100 μL of a solution of 1:1 (v/v)
236 methanol/ultrapure water (ACS/HPLC grade; Burdick and Jackson, Muskegon, MI,
237 USA and Millipore, Bedford, MA, USA) into the microtube, and washed five times in
238 the same solution.

239 Pools of oocytes or individual embryo were placed on a unique spot on the MALDI
240 target plate under the stereomicroscope. Samples were allowed to dry at room
241 temperature, and their location was recorded. Just before analysis, 1 μL of 1.0 M of 2,5-
242 dihydroxybenzoic acid (DHB) diluted in pure methanol was deposited on each target
243 spot to cover the embryos and the spots were allowed to dry at room temperature.

244

245 *MALDI-MS Data Acquisition*

246

247 MALDI-MS and MALDI-MS/MS data were acquired in the positive ion and reflectron
248 modes using an Autoflex III MALDI time-of-flight mass spectrometer (Brucker
249 Daltonics, Bremen, Germany) equipped with smart beam laser technology. The MS data
250 were acquired in the 700-1200 m/z range by averaging 1,500 consecutive laser shots
251 with a frequency of 200 until signals in the region of interest were observed and then
252 disappeared due to the consumption of the sample. MALDI-MS/MS were manually
253 acquired by increasing the collision energy until extensive dissociation of the precursor
254 ion was observed. Argon was used as the collision gas. FlexAnalysis 3.0 software
255 (Brucker Daltonics) was used to check the mass spectra. The most intense ions that

256 were clearly distinct from noise after the exclusion of isotopic peaks were considered
257 from each spectrum and used as the starting point to search for m/z values
258 corresponding to lipids.

259

260 *2.5. Statistical analysis*

261

262 Rates of cleavage, blastocyst and hatched blastocyst formation were analyzed by
263 ANOVA using the GLIMMIX procedure of SAS version 9.0 (SAS/STAT, SAS Institute
264 Inc., Cary, NC) for normal distribution. Significance was considered at $p < 0.05$. Values
265 are presented as means \pm SD. For lipid mass spectrometry profiles, multivariate
266 statistical models were used. A first principal component analysis (PCA) was performed
267 using Pirouette v.3.11 (Infometrix Inc., Woodinville, WA, USA).

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282 **3. Results**

283

284 *3.1. Phospholipids detected by MALDI-MS in maturation media*

285

286 Lipid profiles of maturation media, before and after IVM, were not different (Figure 2),
287 irrespectively COCs presence. However, lipid profile differed between TCM and TCM-
288 PL, indicating that the peaks appearing in the mass spectra belong to the added PL
289 (Figures 1-2).

290

291 *3.2. Lipid profile of bovine oocytes matured in vitro with PL in the presence or absence*
292 *of cumulus cells*

293

294 Lipid profile was not different among oocytes matured in the presence of cumulus cells
295 (cumulus oocyte complexes) in control medium and PL-supplemented medium (Figure
296 3). On the other hand, denuded oocytes matured in TCM or TCM-PL changed its lipid
297 profile when compared with COCs (Figure 4). These cumulus cell-free oocytes contain
298 primarily unsaturated and monounsaturated phosphatidylcholines [PC(32:0) H+];
299 [PC(34:0) H+]; [PC(34:1) H+], rich in unsaturated stearic acid (18:0) and monoenoic
300 oleic acid (18:1), while oocytes matured with cumulus cells contain preferentially
301 polyunsaturated phosphatidylcholines [PC(36:2) Na+]; [PC(36:4) Na+]; [PC(38:6) H+].
302 Table 1 presents the most significant lipids indicated by the PCA analysis (figure 7).

303

304 *3.3. Lipid profile and preimplantational development of bovine IVP embryos*

305

306 *In vitro* maturation of bovine COCs in PL-supplemented medium does not affect the

307 lipid profile of IVP-derived embryos (Figure 5). PCA analysis shows that the two
308 experimental groups were not clearly separated (Figure 6). The total cleavage rate was
309 not different in the control group (81.3%) and TCM-PL group (80.4%) ($p>0.05$). There
310 was no difference in the blastocyst rate (44.19 % and 44.15%) or in the hatching rates in
311 relation to the total number of blastocysts (69.41% and 66.42%) between COCs matured
312 in control medium and in TCM medium supplemented with PL, respectively (Table 2).

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333 **4. Discussion**

334

335 Herein we describe the analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass
336 spectrometry (MALDI-MS) of PL-supplemented maturation media, oocytes, and
337 embryos resulting from *in vitro* fertilization. Biological samples were moisturized with
338 the matrix solution and characteristic lipid (represented by phosphatidylcholines,
339 sphingomyelins and triacylglycerols) profiles were obtained via MALDI-MS. The
340 MALDI-MS technique has a high sensitivity (Ceglarek et al., 2002) and has been
341 currently used in various fields of science. Studies on the lipid profile of culture media
342 used in IVP of bovine embryos have pointed out the accuracy and authenticity of this
343 technique (Ferreira et al., 2009; Ferreira et al, 2010).

344 In this study we found that the PL 99% purity added to IVM medium represents a
345 combination of several species of phospholipids, indicated by different intensity peak
346 ion, being characterized as a complex mixture. The structural composition of this PL
347 consists predominantly of phosphocholines containing polyunsaturated fatty acyl
348 residues and culture media lipid fingerprint by MALDI-MS allows differentiation
349 among PL-supplemented and PL-free TCM media. However, the MALDI-MS of the *in*
350 *vitro* matured oocytes demonstrated that lipid profile of control or PL-supplemented
351 groups were not different. Similarly, no differences were observed in the lipid profile
352 and embryogenesis (cleavage, blastocyst and hatching rates) of embryos resulting from
353 *in vitro* fertilization of PL-treated oocytes during maturation. At this point, it is
354 important to consider that the time of oocytes exposure to PL was only 24 hours, while
355 in embryo culture this exposure is more prolonged, lasting up to 10 days. Perhaps, there
356 has not been sufficient exposure time for the incorporation of PL to the oocyte or to
357 affect the lipid membranes and other structures. One must also consider that the

358 concentration used for PL (10 μ M) may have been insufficient for incorporation by
359 oocytes. The first successful evidence of oocyte maturation medium supplementation
360 with fatty acids used the t10, c12 CLA (Lapa et al., 2011), conjugated linoleic acid,
361 where the authors obtained an improvement in cytoplasmic competence of bovine
362 oocytes from supplemented medium, increasing the rate of blastocyst formation with
363 appropriate morphology. However, there are no studies demonstrating by MALDI-MS
364 if lipids added to the maturation medium are incorporated by the oocyte and if lipid
365 supplementation of oocyte during IVM may influence the resulting embryo lipid profile.
366 This would be a promising strategy to increase cryotolerance of the oocyte and embryo
367 of mammals. The serum added to conventional embryo culture medium, not only
368 increases the lipid concentrations (total lipid content) but also promotes changes in its
369 composition (Sata et al. 1999; Reis, et al. 2003; et Charpigny al. 2003). Pereira et al.
370 (2008) demonstrated that the increased survival of blastocysts cultured with t10, c12
371 CLA appears to be related to a reduction in excessive intracellular lipid accumulation.
372 Another studies using this same isomer also showed that it is able to exert an inhibitory
373 effect on uptake and/or lipid production by the cells (Park et al. 1997; Brown et al.
374 2001). However, in our study there was no difference in lipid profile between
375 supplemented and control groups, suggesting that the addition of PL in IVM medium, at
376 the concentration of 10 μ M, produced no impact on the lipid composition of the
377 embryo.

378 Fatty acids have previously been shown to be related with oocyte maturation and
379 fertility in mammalian species (Matorras *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2001, Zeron *et al.*,
380 2001) as well as with embryo development (Waterman and Wall, 1988; Haggarty *et al.*,
381 2006; Pereira *et al.*, 2007). Since no difference was observed in the lipid profile
382 between oocytes matured in medium supplemented with PL or conventional medium, an

383 influence on the lipid profile of the oocyte by cumulus cells was taken into account. In
384 fact, the results obtained by MALDI-MS in the present study showed differences in
385 lipid profile among oocytes matured in the presence or absence of cumulus cells.
386 Oocytes matured with cumulus cells (COC) contain PC ions with higher degrees of
387 unsaturation in the fatty acyl residues, such as those of m/z 783 [PC (36:4) + Na⁺], 807
388 [PC (38:6) + Na⁺] and 809 [PC (38:5) + H⁺]. On the other hand, denuded oocytes
389 contain PC ions with predominantly unsaturated (18:0) or monoenoic (18:1) fatty acyl
390 residues, such as m/z 735 [PC(32:0) H⁺]; 747 [PC(34:0) H⁺]; 761 [PC(34:1) H⁺]. Thus,
391 differences in PC profiles between COCs and denuded oocytes matured *in vitro* were
392 indicated to occur. Likewise, Ferreira *et al.* (2010) demonstrated by MALDI-MS
393 differences in PC profiles between bovine oocytes and embryos at the blastocyst stage.
394 Our results suggest a modulatory role of cumulus cells on the lipid uptake and/or lipid
395 profile of oocyte during IVM. In fact, Homa and Brown (1992) had already observed
396 that cumulus cells of bovine oocytes control the intake of fatty acids, such as linoleic
397 acid, from the follicular fluid to the oocyte, participating in the inhibitory mechanism of
398 resumption of meiosis *in vivo*. Cumulus cells communicate with the oocyte by an
399 extensive network of transmembrane channels known as gap junctions, providing
400 nutritional support and transporting ions and other molecules from follicular cells to the
401 oocyte (Ancioto *et al.*, 2004). Moreover, the integrity of COC plays an important role
402 on regulation of bovine oocyte maturation and on its metabolic control and removal of
403 cumulus cells from oocyte during IVM significantly reduces the subsequent embryo
404 development (Zhang *et al.*, 1995; Shioya *et al.*, 1998).
405 High levels of intracellular lipids, especially those rich in saturated fatty acids, can be a
406 limiting factor in cryopreservation (Nagashima *et al.*, 1994; Leibo and Loskutoff, 1993;
407 Leibo *et al.*, 1995). A wide variety of PL is used by cells to construct stable and

408 functional membranes in a finely balanced equilibrium, and PL composition,
409 chain length and degree of unsaturation determines most of the physic-chemical cell
410 membrane properties such as fluidity, permeability and thermal phase behavior (Edidin,
411 2003). MALDI-MS lipid fingerprint can help cryopreservation studies of a variety of
412 cells, including oocytes from patients undergoing cancer treatment (Ferreira *et al.*,
413 2010).

414 Our hypothesis is that cryopreservation media supplementation with phospholipid can
415 reduce the adverse effects of cryopreservation on oocyte, increasing cryotolerance by
416 influence structural features of the plasma membranes. Studies evaluating this potential
417 role of PLs are being designed by our group in order to optimize the protocols for
418 oocyte cryopreservation.

419

420 **Conclusions**

421

422 The MALDI-MS technique has allowed obtaining informative lipid profiles for culture
423 media and *in vitro* matured oocytes. Differences in PC profiles among oocytes matured
424 with or without cumulus oophorus suggest that cumulus cells can modulate the lipid
425 uptake and/or lipid profile of oocyte during IVM. The use of MALDI-MS to compare
426 the lipid profile of IVM and/or cryopreserved oocytes may bring contributions to
427 determine appropriate lipid supplementation of IVM/vitrification media and to identify
428 biomarkers of post-cryopreservation human oocytes survival.

429

430 **Acknowledgments**

431

432 The authors wish to thank the Barra Mansa meat plant, Sertãozinho/SP, for supplying
433 the bovine ovaries.

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447 **References**

448

449 Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in
450 bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems
451 using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev* 2002;61(1):57-66.

452

453 Ancieto KL, Vantini R, Garcia LM, Mingoti GZ. Influência das células do cumulus e do
454 meio de maturação in vitro de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da
455 competência do desenvolvimento embrionário. *Act Sci Vet.* 2004; 32:118.

456

457 Arav A, Y. Zeron, Leslie SB, Behboodi E, Anderson GB, Crowe JH. Phase transition
458 temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. *Cryobiology* 1996;33(6):589-
459 599.

460

461 Brown JM, Halvorsen YD, Lea-Currie YR, Geigerman C, McIntosh M. Trans-10, cis-
462 12, but not cis-9, trans-11, conjugated linoleic acid attenuates lipogenesis in primary
463 cultures of stromal vascular cells from human adipose tissue. *J Nutr*, 2001. 131:2316-
464 2321.

465

466 Ceglarek U, Müller P, Stach B, Bührdel P, Thiery J, Kiess W. Validation of the
467 phenylalanine/tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry: sensitive
468 newborn screening for phenylketonuria. *Clin Chem Lab Med* 2002;40(7):693-697.

469

470 Charpigny G, Guesnet P, Marquant-LeGuine B, Heyman Y, Mermillod P, Humblot P.
471 Fatty acid composition of triglycerides, phosphatidylcholines and
472 phosphatidylethanolamines of bovine embryos. *Les. Actes du BRG* 2003;4: 159–172.

473

474 Edidin M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cel*
475 *Biol* 2003; 4:414-418.

476

477 Ferguson EM, Leese HJ. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J*
478 *Reprod Fertil* 1999;116:373–8.

479

480 Ferreira CR, Souza GHMF, Riccio MF, Catharino RR, Pontes JHF, Basso AC, Junior
481 JCE, Perecin F, Eberlin MN. Mass spectrometry fingerprinting of media used for in
482 vitro production of bovine embryos. *Rapid Comm Mass Spectromy* 2009;23: 1313-
483 1320.

484

485 Ferreira CR, Saraiva SA, Catharino RR, Garcia JS, Gozzo FC, Sanvido GB, Santos LF,
486 Lo Turco EG, Pontes JH, Basso AC, Bertolla RP, Sartori R, Guardieiro MM, Perecin F,
487 Meirelles FV, Sangalli JR, Eberlin MN. Single embryo and oocyte lipid fingerprinting
488 by mass spectrometry. *J Lipid Res.* 2010;51(5):1218-27.

489

490 Genicot G, Leroy JLMR, Van Soom A, Donnay I. The use of a fluorescent dye, Nile
491 red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. *Theriogenology* 2005;
492 63:1181–1194.

493

494 Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. London: Cambridge University
495 Press, 1994.

496

497 Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive
498 oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod*
499 *Update* 2001;7(2):175-189.

500

501 Haggarty P, Wood M, Ferguson E, Hoad G, Srikantharajah A, Milne E, Hamilton M,
502 Bhattacharya S. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. *Hum Reprod*
503 2006; 21:766-773.

504

505 Homa ST, Racowsky C, McGaughey RW. Lipid analysis of immature pig oocytes. *J*
506 *Reprod Fertil* 1986;77(2):425-434.

507

508 Homa e Bronw 1992. Changes in linoleic acid during follicular development and
509 inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in cumulus-free bovine
510 oocyte. *J Reprod Fertil* 1992;94:153-160.

511

512 Homa ST, Brown CA. Changes in linoleic acid during follicular development and
513 inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in cumulus-free bovine

514 oocytes. *J Reprod Fertil* 2011; 94:153-60.
515
516 Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M, Fukui Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and
517 frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction*
518 2001;122:131-8.
519
520 Lapa M, Marques CC, Alves SP, Vasques MI, Baptista MC, Carvalhais I, Silva Pereira
521 M, Horta AE, Bessa RJ, Pereira RM. Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid
522 on bovine oocyte competence and fatty acid composition. *Reprod Domest Anim*,
523 2011. 46:904-10.
524
525 Leibo SP, Loskutoff NM. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos.
526 *Theriogenology* 1993;39:81-94.
527 Leibo SP, Pollard JW, Martino A. Chilling and freezing sensitivity of "reassembled" in
528 vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 1995;43:265.
529
530 Loewenstein JE, Cohen AI. Dry mass, lipid content and protein content of the intact and
531 zona-free mouse ovum. *J Embryol Exp Morph* 1964;12:113-21.
532
533 Marhhom E, Cohen I. Fertility preservation options for women with
534 malignancies. *Obstet Gynecol Surv* 2006; 62:58- 72.
535
536 Matorras, R., Ruiz, J.I., Mendoza, R., Ruiz, N., Sanjurjo, P. and Rodriguez-Escudero,
537 F.J. Fatty acid composition of fertilization-failed human oocytes. *Hum. Reprod* 1998;
538 13: 2227-2230.
539
540 McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS, Speake BK. Fatty acid
541 composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona
542 pellucida. *J Reprod Fertil* 2000;118:163-70.
543
544 Miles EA, Calder PC. Modulation of immune function by dietary fatty acids. *Society*
545 *Production and Nutrition* 1998;57:277-292.
546

547 Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Seamark RF, Nottle MB.
548 Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling.
549 Biol Reprod 1994;51:618–22.
550
551 Park Y, Albright KJ, Liu W, Storkson JM, Cook ME, Pariza MW. Effect of conjugated
552 linoleic acid on body composition in mice. Lipids 1997;32:853-8.
553
554 Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by
555 heparin. Biol Reprod 1988;38:1171-1180.
556
557 Pereira RM, Baptista MC, Vasques MI, Horta AE, Portugal PV, Bessa RJ, Silva JC,
558 Pereira MS, Marques CC. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture
559 with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). Anim Reprod Sci
560 2007;98:293-301.
561
562 Reis A, Rooke JA, McCallum GJ, Ewen M, Lomax MA, McEvoy, TG. Stress-
563 associated developmental arrest following in vitro ovine embryo culture in the presence
564 of docosahexaenoic acid (DHA). Reproduction 2003;30:48.
565
566 Rosenkrans CF, Jr., First NL. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and
567 developmental rate of bovine zygotes in vitro. J Anim Sci 1994;72:434-437.
568
569 Sata R, Tsujii H, Abe H, Yamashita S, Hoshi H. Fatty acid composition of bovine
570 embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic
571 development. J Reprod Dev 1999;45: 97–103.
572
573 Shioya, Y.; Kuwayama, M.; Fukushima, M. et al. *In vitro* fertilization and cleavage
574 capability of follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro.
575 Theriogenology 1998; 30:489-489.
576
577 Sturmey RG, Leese HJ. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos.
578 Reproduction 2003;126:197–204.
579

580 Tominaga K, Hamada Y, Yabuue T, Ariyoshi T. J. Effect of linoleic acid-albumin on
581 post-thaw survival of *in vitro*-produced bovine embryos at the 16-cell Stage. Vet. Med.
582 Sci. 2000;62(4): 465–467.

583

584 Vireque AA, Camargo LS, Serapiao RV, Rosa ESAA, Watanabe YF, Ferreira EM,
585 Navarro PA, Martins WP, Ferriani RA. Preimplantation development and expression of
586 Hsp-70 and Bax genes in bovine blastocysts derived from oocytes matured in alpha-
587 MEM supplemented with growth factors and synthetic macromolecules.
588 Theriogenology. 2009;71:620-627.

589

590 Waterman RA, Wall RJ. Lipid interactions with in vitro development of mammalian
591 zygotes. Gamete Res 1988;21:243-254.

592

593 Zhang, L.; Jiang, S.; Wozniak, P.J. et al. Cumulus cell function during bovine oocyte
594 maturation, fertilization, and embryo development in vitro. Mol Reprod Devel 1995;
595 40:338-344.

596

597 Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D, Arav A. Seasonal changes in
598 bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties
599 and fatty acid composition of follicles. Reproduction 2001; 121:447-454.

600

601 Zeron Y, Tomczak M, Crowe J., Arav A. The effect of liposomes on thermotropic
602 membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for
603 reducing chilling sensitivity. J Reprod Fertil 2002;45:43-152.

604

605

606

607

608

609

610

611

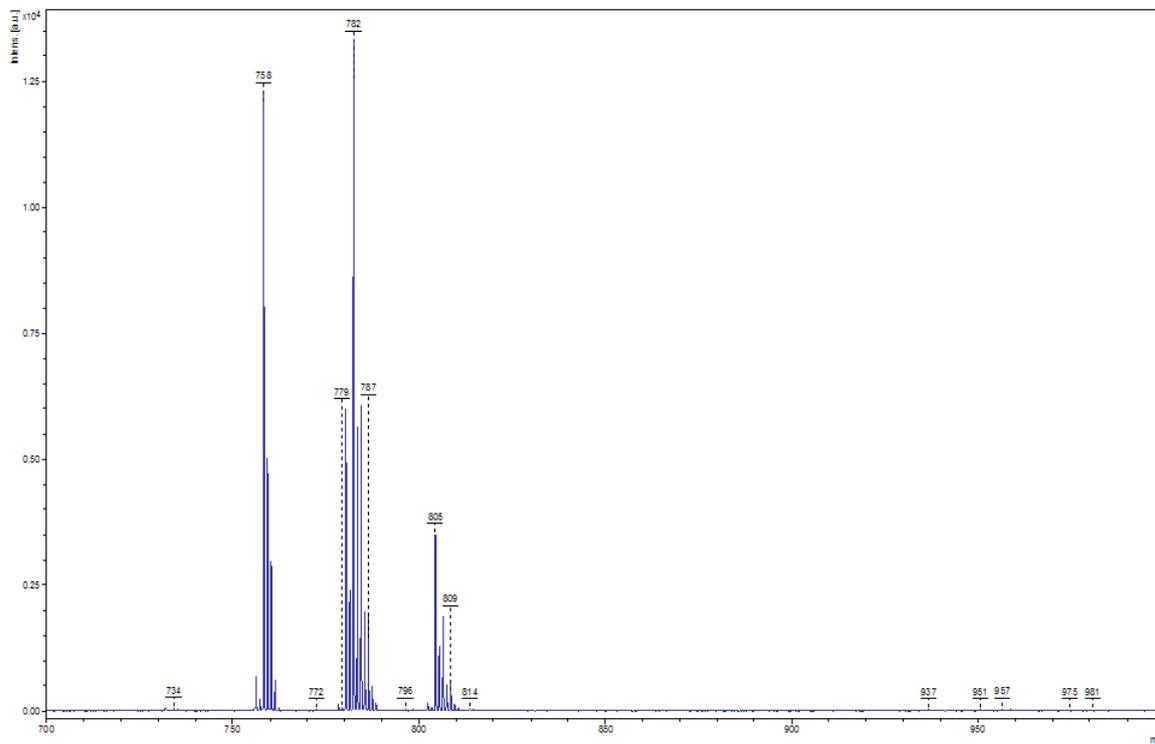
612

613

614 **Figures and tables**

615

616



617

618

619 Figure 1. MALDI-MS in the positive ion mode for PL 99% added to *in vitro* maturation
620 media.

621

622

623

624

625

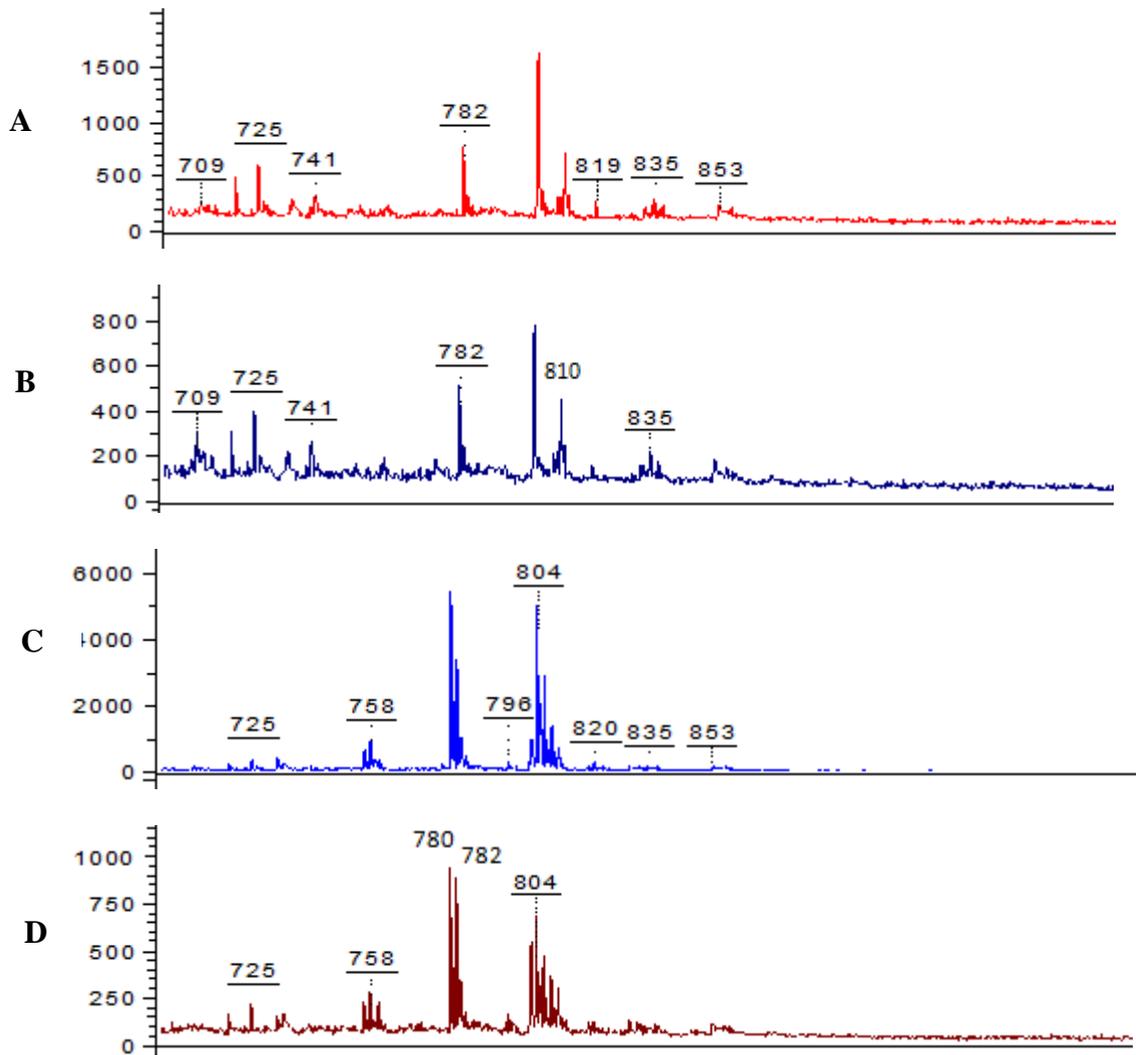
626

627

628

629

630



631

632

633

634

635

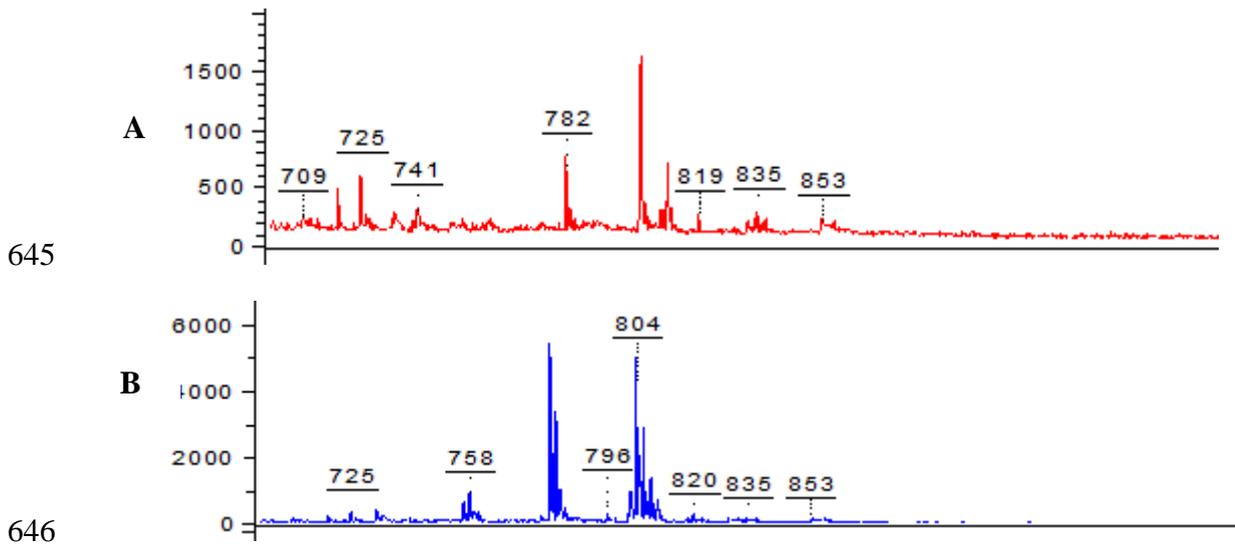
636 Figure 2. MALDI-MS in the positive ion mode for TCM-199 media before and after
637 oocyte maturation. (A) TCM (control) before culture; (B) TCM (control) + COCs (after
638 culture); (C) TCM-PL before culture; (D) TCM-PL+COCs (after culture). The spectra
639 were obtained by MALDI-TOF MS with DHB matrix in the positive mode of
640 ionization.

641

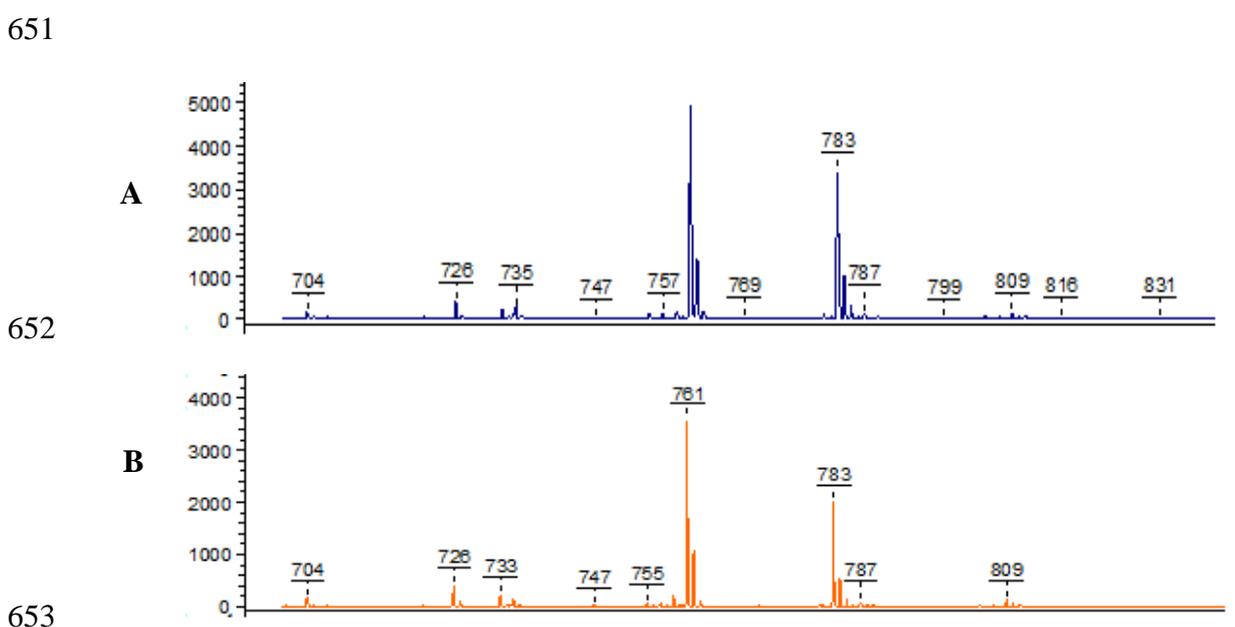
642

643

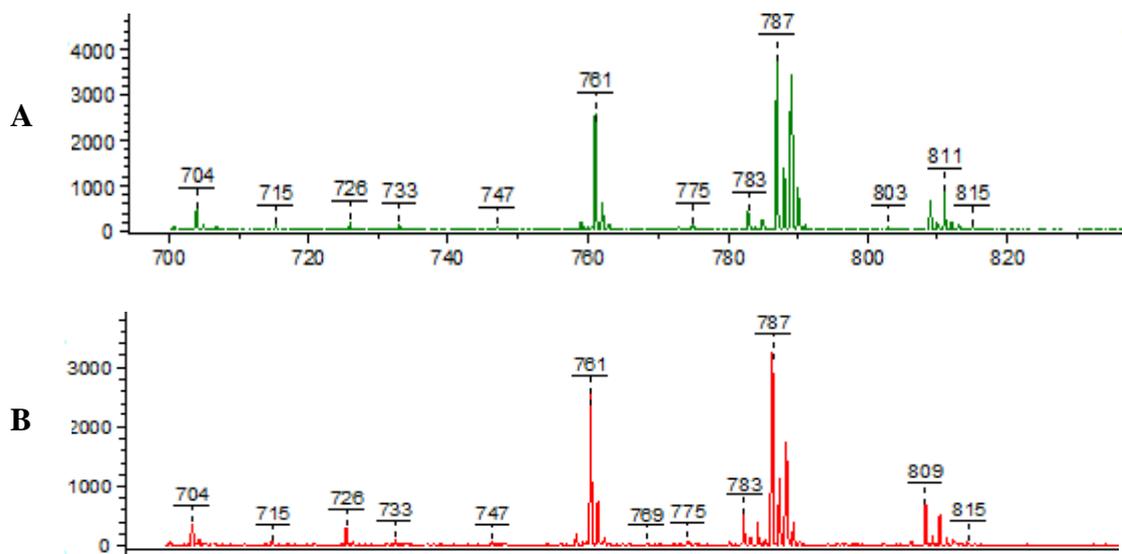
644



645
646
647
648 Figure 3. Representative MALDI-MS in the positive ion mode for oocytes (COCs)
649 matured in TCM-199 medium supplemented with phospholipid (PL). (A) TCM (control
650 group without PL (n= 60); (B) TCM-PL (n= 59).



651
652
653
654
655 Figure 4. Representative MALDI-MS in the positive ion mode for denuded oocytes
656 (DOs) matured in TCM-199 medium supplemented with phospholipid (PL). (A) TCM
657 (control group without PL; n= 70); (B) TCM-PL (n= 65)



659

660

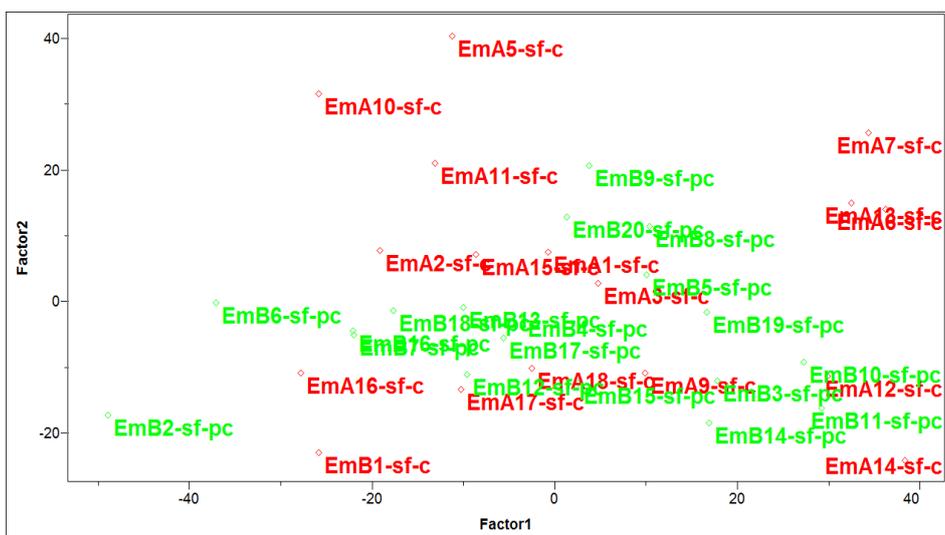
661

662 Figure 5. Representative MALDI-MS in the positive ion mode for individual embryos
 663 derived from oocytes matured in TCM-199 medium supplemented with phospholipid
 664 (PL). (A) TCM (control group; without PL); (B) TCM-PL

665

666

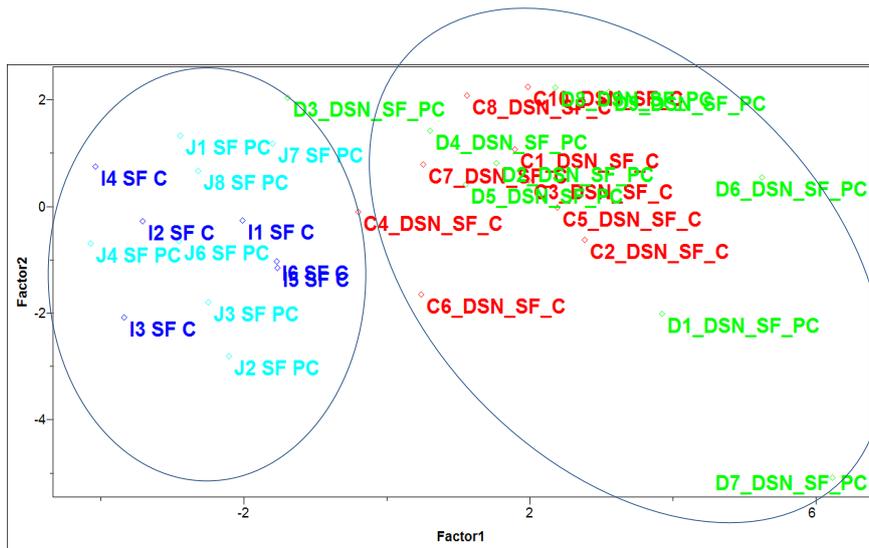
667



668

669 Figure 6. PCA plot for the MALDI-MS data of single embryos derived from oocytes
 670 matured in TCM-199 medium supplemented or not with phospholipid (PL). N=
 671 20/group.

672



673

674 Figure 7. PCA plot for the MALDI-MS data of oocytes of all samples from COCs or
675 denuded oocytes (DOs) matured in TCM-199 medium supplemented with phospholipid
676 (PL). (A) TCM (control group without PL; n= 75); (B) TCM-PL (n= 77). Note the
677 separation of ions between groups of denuded oocytes (identified in red and green) and
678 the cumulus-oocyte complexes (marked in light blue and dark blue), indicating the
679 difference between these groups.

680

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691 Table 1. Significant phosphatidylcholines (PC) and sphingomyelins (SM) indicated in
 692 PCA analysis via MALDI-MS of maturation media, oocytes and *in vitro* produced
 693 embryos.
 694

<i>m/z</i>	COCs	DOs	Lipid Ion (carbons:unsaturation)
704		X	[SM (16:0) + H] +
707		X	[PC (30:0) + H] +
721	X		[PC (32:0) + H] +
726	X		[SM (16:0) + Na] +
735		X	[PC(32:0) + H] +
747		X	PC (34:0) + H] +, [PC (34:1) + H] +
755	X		[PC (32:1) + Na] +
757	X		[PC (32:0) + Na] +
761		X	[PC (34:1) + H] +
775		X	[PC (32:1) + Na] +
781	X		[PC (34:2) + Na] +, [PC (36:5) + H] +
783	X		[PC (36:4) + H] +, [PC (34:1) + Na] +
789		X	[PC (36:1) + H] +
805		X	[PC (38:7) + H] +, [PC36:4 + Na] +
807	X		[PC (38:6) + H] +, [PC36:3 + Na] +
809	X		[PC (38:5) + H] +, [PC (36:2) + Na] +

695
 696 Identification based on lipid databases (<http://lipidsearch.jp> or www.lipidmaps.org).
 697

698
 699
 700

701 Table 2. Embryonic development of bovine oocytes matured *in vitro* in TCM-199
 702 medium supplemented with phospholipid (PL)

703

Treatment	Oocytes	% Cleavage (<i>n</i>)	% Blastocysts (<i>n</i>)	% Hatching (<i>n</i>)
		72 hpi	168-192 hpi	224 hpi
TCM	563	82,23 (463) ^a	43,69 (246) ^a	69,1 (170) ^a
TCM+PL	553	81,37 (450) ^a	45,38 (251) ^a	69,3 (174) ^a

704

705 Hpi: hours post-insemination. a and b: within a column, values without a common letters
 706 differed ($P < 0.05$).

707