UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GABRIELLA MAMEDE ANDRADE

**Prospecção retrospectiva de lipídios presentes no líquido folicular
associados ao potencial de desenvolvimento dos oócitos**

Pirassununga
2013

GABRIELLA MAMEDE ANDRADE

**Prospecção retrospectiva de lipídios presentes no líquido folicular
associados ao potencial de desenvolvimento dos oócitos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração:
Qualidade e Produtividade Animal

Orientador:
Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles

Pirassununga
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

A553p Andrade, Gabriella Mamede
 Prospecção retrospectiva de lipídios presentes no
 líquido folicular associados ao potencial de
 desenvolvimento dos oócitos / Gabriella Mamede Andrade.
 -- Pirassununga, 2013.
 94 f.
 Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
 Departamento de Medicina Veterinária.
 Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.
 Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles.

 1. Células do folículo 2. Lipídios 3. Líquido
folicular 4. Qualidade oocitária. I. Título.

Dedico este trabalho....

*minha mãe **Viviane**,
professora por excelência,
me ensinou, com amor, os valores
mais importantes que hoje possuo;*

*Ao meu pai **Marcelo**
pela simplicidade, cumplicidade
e amor incondicional,*

*À minha irmã **Marcella**,
que além do exemplo,
da amizade e do companheirismo,
junto com meu cunhado (**André Jr**)
me deram o melhor presentinho
que eu poderia desejar – **Sofia**,*

*Ao **Fernando**
pela compreensão, apoio,
amizade e companheirismo.*

Agradecimentos

À **Deus** pelo dom da vida e pela saúde para ir em busca dos meus sonhos;

Ao **Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles**, pela oportunidade, confiança, ensinamentos e disposição em sempre ajudar;

Ao **Prof. Dr. Felipe Perecin, Prof. Dr. Edson Lo Turco, Dra. Christina Ferreira, Dra. Thaís Regiani** vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto, obrigada pelo apoio, paciência, conselhos e opiniões;

A todos **do LMMD**, Aline, Helena, Ju, Rafa, Juliano, Pedrinho, Laís, M^a Carol, Naira, Aninha, Camila, Mari, Natália, Tiagos, Rô, Marcos, Hugo, Ramón, Martini, Mateus, Maite, Fer, Alessandra, Três, Vanessa, Nina, Lídia, Carolzinha, ao Léo (Motoboy), também aos que não foram citados, todos vocês contribuíram para a realização desse trabalho, tirando uma dúvida, ajudando, emprestando material ou simplesmente fazendo companhia;

À todos os **Funcionários do serviço de Pós-graduação e Laboratórios parceiros**, pela colaboração, a ajuda de vocês foi fundamental;

À **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos** poder estudar e fazer pesquisa nesse campus é um privilégio;

À **FAPESP** e à **CAPES** pela concessão de bolsa de estudo;

À toda minha família, amigas e amigos do Prata-MG e de Uberlândia-MG, por entenderem a minha ausência em vários momentos e pelo apoio incondicional sempre, vocês mesmo de longe são meu porto seguro.

A chave de todas as ciências é negavelmente o ponto de interrogação.

Honoré de Balzac

RESUMO

ANDRADE, G. M. **Prospecção retrospectiva de lipídios presentes no líquido folicular associados ao potencial de desenvolvimento dos oócitos.** 2013. 94f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

A produção *in vitro* de embriões, no Brasil, ocupa lugar de destaque dentre as biotecnologias da reprodução animal e o atual desafio é torná-la cada vez mais acessível, para tanto, é fundamental aproximar os resultados de produção e sobrevivência dos embriões produzidos *in vitro* daqueles desenvolvidos naturalmente. Boa parte desta variação do potencial de desenvolvimento do embrião está relacionada à características do oócito. Há a possibilidade de essa capacidade estar relacionada ao perfil lipídico do líquido folicular e das células do folículo, neste sentido, este projeto teve como objetivo principal avaliar a correlação do potencial de desenvolvimento de oócitos com o conteúdo do perfil lipídico no líquido folicular e das células foliculares, baseado no sistema de ativação partenogenética, cultivo individual e análise retrospectiva. Não existe, até o momento, uma caracterização detalhada do microambiente folicular, um componente importante dos fluídos são os lipídios e recentemente tem sido demonstrado que eles estão envolvidos em vários aspectos do metabolismo além de também funcionarem como moléculas sinalizadoras ou até mesmo serem capazes de induzir modificações na cromatina. Os íons oriundos do estudo do perfil lipídico foram avaliados em comparação ao potencial de desenvolvimento do oócito. No conjunto de dados do MALDI observou-se maior concentração de triacilglicerídeos, principalmente contendo ácidos graxos como o oleico, linoleico e esteárico nos líquidos foliculares e células do folículo provenientes do ambiente

folicular de oócitos que clivaram. No perfil lipídico do líquido folicular feito por LC-MS/MS os lipídios identificados foram de classes diversas, com participação expressiva no modo positivo de triacilgliceróis, fosfatidilcolinas, esfingomielinas, monoacildiacilglicerídeos entre outros e no modo negativo a classe lipídica que prevaleceu foi dos lipídios mitocondriais, as cardiolipinas. Também foram detectados lipídios citosólicos como o CE e alguns pouco descritos no líquido folicular como o PIP2 e PIP3, além disso, alguns lipídios foram característicos dos grupos clivados e blastocistos. O perfil lipídico do líquido folicular e das células do folículo é complexo e alguns lipídios deste ambiente tem potencial para serem biomarcadores de qualidade oocitária.

Palavras-chave: Células do folículo, Lipídios, Líquido folicular, Qualidade oocitária.

ABSTRACT

ANDRADE, G. M. **Retrospective analysis follicular fluid lipids associated with the oocytes development potential**. 2013. 94f. Dissertation (Master) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

In vitro embryo production in Brazil occupies a prominent place among the animal reproduction biotechnology, the current challenge is to make it increasingly accessible so it is essential to approach the results of production and survival of in vitro produced embryos of those developed naturally. Much of this potential change of embryo development is related to the oocyte characteristics. There is the possibility of this ability is related to the lipid profile of follicular fluid and follicle cells, in this sense, this project aimed to evaluate the correlation of the oocytes development potential with the content of the lipid profile in follicular fluid and cells follicular, based on parthenogenetic activation, individual cultivation and retrospective analysis system. There isn't, to date, a detailed characterization of the follicular microenvironment, an important component of the follicular fluid and cells are the lipids and recently has been shown that they are involved in various aspects of metabolism in addition also function as signaling molecules or even be capable of inducing changes in chromatin. Derived ions from the study of lipid profile were evaluated compared with oocyte developmental potential. In MALDI dataset observed triacylglycerides higher concentration, mainly containing fatty acids such as oleic, linoleic and stearic acids in follicular fluid and follicle cells from follicular environment of cleaved oocytes. In follicular fluid lipid profile done by LC-MS/MS lipids were identified in different classes, with significant participation in positive mode of triacylglycerols, phosphatidylcholines, sphingomyelins, monoacyldiacylglycerides among others and in negative mode prevailed lipid class was of mitochondrial lipids, the cardiolipin. Cytosolic lipids were also detected as CE and some little

follicular fluid as described in the PIP2 and PIP3, and others lipids were characteristic of cleaved and blastocysts groups. The lipid profile of follicular fluid and follicle cells is complex and some of this lipid environment has the potential to be biomarkers of oocyte quality.

Key-words: Follicle cells, lipids, follicular fluid, oocyte quality.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fotomacrografias do procedimento de dissecação do folículo ovariano. Em (A) os instrumentos cirúrgicos utilizados, em (B) o folículo sendo separado do ovário, em (C) um folículo sendo dissecado e em (D) os folículos dissecados separados de acordo com o ovário de origem, em placa de Petri de 60mm..... 43
- Figura 2** - Sequência dos procedimentos após dissecação dos folículos ovarianos. Em (A) folículos sob esteromicroscópio; em (B) utilização do paquímetro para determinação do diâmetro folicular e em (C) rompimento do folículo ovariano bovino com utilização de agulhas 18G. Em (D) fotomicrografia do folículo ovariano rompido e oócito..... 45
- Figura 3** - Fotomicrografias de oócitos bovinos. Observa-se em (A) oócito imaturo, em (B) oócito desnudo e em (C) oócito maturo. A seta aponta o primeiro corpúsculo polar..... 45
- Figura 4** - Fotomicrografias de embriões bovinos. Na foto (A) um embrião de duas células, em D2, dia da contagem dos clivados, e na foto (B) um embrião em D7, dia da contagem dos blastocistos..... 51
- Figura 5** - Heatmaps mostrando no geral a distribuição dos lipídios dentro dos grupos experimentais, nas colunas diferentes lipídios (m/z) detectados pelo equipamento, nas linhas as amostras e as cores representam as intensidades. Dados foram agrupados de acordo com os grupos experimentais sendo o vermelho o grupo dos Blastocistos, o verde o grupo dos Clivados e em azul o grupo dos Não-clivados. Em (A) heatmap do MALDI do líquido folicular e em (B) o heatmap do MALDI das células do cumulus (exp. 2)..... 52
- Figura 6** - Representação gráfica 3D entre os componentes principais 1, 2 e 3. Em (A) PCA e em (B) PLS-DA. Os triângulos representam as amostras, em vermelho o grupo dos blastocistos, em verde os clivados e em azul os não-clivados..... 52
- Figura 7** - Íons importantes para o PLS-DA. As caixas coloridas à direita relacionam as concentrações dos metabólitos selecionados em cada grupo experimental. Da esquerda para a direita blastocistos, clivados e não-clivados..... 53
- Figura 8** - Gráfico dos íons identificados como importantes pelo PLS-DA do MALDI do líquido folicular e suas respectivas intensidades de detecção e desvios padrões..... 53
- Figura 9** - Gráfico dos lipídios identificados na ANOVA. No eixo X os lipídios e no eixo Y a intensidade de detecção..... 54

- Figura 10** - Lipídio diferente entre os grupos Clivados e Não Clivados que pôde ser identificado baseado na literatura como PC 18:2/22:5 + H⁺..... 56
- Figura 11** - Espectros de dados MALDI-MS das células do folículo. Em (A) Não-Clivados, (B) Clivados e (C) Blastocistos. O eixo X corresponde aos íons detectados e o eixo Y mostra a intensidade relativa..... 57
- Figura 12** - Gráficos de barras dos íons estatisticamente diferentes no teste ANOVA, com $p < 0,05$ de significância. Nos eixos x os grupos NCLIV, CLIV e BLAST, nesta ordem e no eixo Y a intensidade relativa (%). A barra de erros representa o desvio padrão dos grupos experimentais..... 58
- Figura 13** - Representação 3D do PLS-DA das células do folículo. Os triângulos representam as amostras, em vermelho os blastocistos, em verde os clivados e em azul os não clivados..... 59
- Figura 14** - Íons identificados pelo PLS-DA como importantes. As caixas coloridas à direita relacionam as concentrações dos metabólitos selecionados em cada grupo experimental. Da esquerda para a direita blastocistos, clivados e não-clivados..... 59
- Figura 15** - Diagrama de Venn dos lipídios, 15 presentes nos NCLIV, 7 nos CLIV e 8 nos BLAST, 8 comuns entre NCLIV e CLIV, 5 entre CLIV e BLAST e 9 entre NCLIV e BLAST, e 125 comuns a todos os grupos estudados. Foram considerados lipídios presentes no grupo quando detectados em mais de 70% das amostras deste grupo..... 60
- Figura 16** - Quadro de identificação dos lipídios representados numericamente no diagrama de Venn..... 61
- Figura 17** - Espectros de LC-MS do líquido folicular bovino no modo de detecção positivo. (A) Não-clivados, (B) clivados (C) blastocistos..... 63
- Figura 18** - Espectros de LC-MS de líquido follicular bovino em modo negativo. (A) amostra do grupo Não-clivados, (B) amostra do grupo Clivados (C) amostra do grupo Blastocistos..... 64
- Figura 19** - Representação do PLS-DA modo negativo. Os triângulos representam as amostras, sendo os vermelhos do grupo BLAST, os verdes do CLIV e os azuis do NCLIV. A no modo positivo e B no modo negativo..... 65
- Figura 20** - Íons identificados pelo PLS-DA como importantes. As caixas coloridas à direita indicam as concentrações dos lipídios em cada grupo experimental. Da esquerda para a direita blastocistos, clivados e não-clivados..... 65
- Figura 21** - Representação gráfica dos 15 íons mais importantes para o PLS-DA do líquido folicular no modo negativo. No eixo X dos gráficos estão os grupos e no eixo Y a intensidade relativa. Barras representam erro padrão das amostras dentro dos grupos..... 67

- Figura 22** - Gráfico 3D do PLS-DA dos dados em modo positivo do LC-MS/MS. Representados em vermelho o grupo dos blastocistos, em verde o grupo dos clivados e em azul o grupo dos Não-clivados..... 68
- Figura 23** - Íons identificados pelo PLS-DA como importantes, no modo positivo do LC- MS/MS. As caixas coloridas à direita indicam as concentrações dos lipídios em cada grupo experimental. Da esquerda para a direita blastocistos, clivados e não-clivados..... 68
- Figura 24** - Lipídios com variação mais consistente entre os *vip scores* do PLS-DA do modo positivo, barras representam o erro padrão dos grupos..... 69
- Figura 25** - Gráfico dos lipídios diferentes entre os grupos no teste ANOVA do modo positivo, com $p < 0,05$. Barras ilustram erro padrão positivo e negativo..... 69
- Figura 26** - Gráfico referente aos lipídios significativos no teste ANOVA, do modo positivo com lipídios mais intensos. As barras representam a intensidade de detecção dentro de cada grupo e seus respectivos erros padrão..... 70
- Figura 27** - Gráfico 3D da análise de componentes principais PLS-DA *dada fusion* LC-MS/MS. Representados em vermelho o grupo dos blastocistos, em verde o grupo dos clivados e em azul o grupo dos Não-clivados..... 71
- Figura 28** - Íons importantes pelo PLS-DA, do *dada fusion*. Os quadrados coloridos à direita indicam as concentrações dos lipídios em cada grupo experimental. Da esquerda para a direita blastocistos, clivados e não-clivados..... 71
- Figura 29** - Lipídio diferente entre o PLS-DA modo positivo e *dada fusion*..... 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção individual de embriões partenotos, em sistema de co-cultivo com células do cumulus; clivagem (48 h – D2) e blastocistos (D7 e D8).....	50
Tabela 2 - Lipídios do <i>vip score</i> do PLS-DA, do MALDI do líquido folicular, que apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais.....	54
Tabela 3 - Íons identificados com significância estatística pela análise de variância e posteriormente pelo teste t, no MALDI do líquido folicular bovino.....	54
Tabela 4 - Lipídios significativos no teste ANOVA do MALDI do líquido folicular, baseada em experimentos prévios com fragmentação na técnica MALDI.....	55
Tabela 5 - Íons detectados pelo teste ANOVA, nos dados do MALDI das células do folículo, com intensidade maior que 5%, em dados anteriores de MS/MS.....	59
Tabela 6 - Os 15 lipídios mais importantes de acordo com o PSL-DA, modo negativo LC-MS/MS.....	66
Tabela 7 - Lipídios significativos no teste ANOVA e no teste t, no modo positivo do LC-MS/MS, considerando apenas íons intensos.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

1° CP	Primeiro corpúsculo polar
6DF9	Fator de diferenciação do crescimento
6-DMAP	6-dimetilaminopurina
ANOVA	Análise de variância
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Albumina sérica bovina)
CL	Cardiolipinas
COC	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
DHB	Matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid
FA	FA – <i>Fatty acids</i> (Ácidos graxos)
FFA	Ácidos graxos livres (Free fatty acids)
FSH	<i>Follicle stimulating hormone</i> (Hormônio folículo-estimulante)
GH	Hormônio de crescimento
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
VIP	Importância da variável na projeção
IP3	Inositol trifosfato
L	Ácido linoleico
LC-MSMS	Cromatografia líquida em conjunto com espectrometria de massas com aquisição de dados
LH	<i>Luteinizing hormone</i> (Hormônio luteinizante)
MADAG	Monoacildiacilglicerol
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
mg	Miligrama
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitro

mm	Milímetro
mM	Milimolar
MPF	<i>Maturation promoting factor</i> (fator promotor da maturação)
mRNA	RNA mensageiro
MS	Espectrometria de massas
NAPE	N-Acilfosfatidiletanolaminas
O	Ácido oleico
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato salino)
PC	Fosfatidilcolinas
PCA	Análise do componente principal
PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol
PIP2	Glicerofosfoinositol-difosfatos
PIP3	Glicerofosfoinositol-trifosfatos
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PIVE	Produção <i>in vitro de embriões</i>
PL	Fosfolípidos
PLS-DA	Análise discriminatória parcial dos quadrados mínimos
PS	Fosfatidilserina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
S	Ácido esteárico
SFB	Soro Fetal Bovino
SM	Esfingomielinas
SOF	Fluído sintético do oviduto
TAG	Triacilglicerídeos

TCM-199 TCM-199 - Tissue Culture Medium-199 (meio de cultivo de tecidos)

WOW WOW - *Well-of-the-Well*

μl Microlitro

SUMÁRIO

1. Introdução.....	20
1.1. Hipótese.....	22
1.2. Objetivo.....	22
2. Revisão de literatura.....	23
2.1. Oogenese e foliculogenese.....	23
2.2. Competência oocitária.....	26
2.3. Maturação oocitária.....	28
2.4. Líquido folicular.....	31
2.5. Os lipídios no desenvolvimento e na qualidade oocitária.....	33
2.6. Ativação partenogenética.....	35
2.7. Cultivo oocitário e embrionário individual.....	36
2.8. Espectrometria de massas e lipidômica.....	38
3. Delineamento experimental.....	40
4. Material e métodos.....	42
4.1. Loca do experimento.....	42
4.2. Coleta dos ovários, folículos e oócitos.....	42
4.3. Maturação <i>in vitro</i>	44
4.4. Ativação partenogenética.....	45
4.5. Cultivo embrionário <i>in vitro</i>	46
4.6. Preparação das amostras para a análise dos lipídios.....	46
4.6.1. Experimento 1.....	47
4.6.2. Experimento 2.....	47
4.6.3. Experimento 3.....	47
4.7. Otenção do perfil lipídico.....	48

4.7.1. Experimento 1.....	48
4.7.2. Experimento 2.....	48
4.7.3. Experimento 3.....	49
4.8. Análise estatística.....	49
5. Resultados.....	50
5.1. Produção <i>in vitro</i> de blastocistos.....	50
5.2. Análise do perfil lipídico.....	51
5.2.1. Experimento 1: Perfil lipídico do líquido folicular – MALDI.....	51
5.2.2. Experimento 2: Perfil lipídico das células do folículo – MALDI.....	56
5.2.3. Experimento 3: Perfil lipídico do líquido folicular - LC-MS e MS/MS.....	60
6. Discussão.....	73
7. Conclusão.....	78
Referências Bibliográficas.....	79

1. INTRODUÇÃO

O sucesso da produção *in vitro* de embriões bovinos está estritamente relacionado à qualidade dos oócitos (LONERGAN et al., 2003; SIRARD et al., 2003). Essa qualidade refere-se à competência oocitária, que é definida como a habilidade ou potencial de um oócito alcançar sua maturidade, ser fecundado, desenvolver-se até blastocisto e manter a gestação (PORCIUNCULA, 2007). A competência ao desenvolvimento é progressivamente adquirida durante o crescimento folicular (MERMILLOD et al., 2000) e é resultado da interação entre os fatores externos e o microambiente folicular (KRISHER, 2013).

O ambiente folicular é importante para a integridade dos processos de desenvolvimento e para a produção de um oócito de alta qualidade (MOTTA, 2008). O qual é composto por três tipos celulares (células da teca, da granulosa e do cumulus), uma lâmina basal e o fluido folicular, sendo que, cada um tem papel ativo na diferenciação, no crescimento e maturação do gameta (COMBELLES et al., 2010).

O fluido folicular é formado a partir do plasma e da secreção das células da granulosa e da teca no interior do folículo (FORTUNE, 1994). Contém uma grande variedade de moléculas, incluindo proteínas, peptídeos, aminoácidos, hormônios, fatores de crescimento, açúcares, fatores anti-coagulantes, eletrólitos, espécies reativas de oxigênio, entre outros (REVELLI et al., 2009). Este líquido banha o oócito e faz a intermediação da comunicação entre os vários tipos celulares presentes no folículo (HENNET; HOPE; COMBELLES, 2013). Possui várias funções no controle do crescimento do folículo, da maturação nuclear do oócito, e no metabolismo dos espermatozóides (HAFEZ, 2004).

A composição do fluido folicular é um importante indicativo de qualidade oocitária e embrionária, pois reflete todo o metabolismo folicular. Ele contém moléculas regulatórias que são cruciais para o sucesso da maturação dos oócitos (WALLACE et al., 2012). O nível de nutrientes deste fluido varia de acordo com a dominância do folículo e o estágio do ciclo estral (ORSI et al., 2005). Sua composição não reflete diretamente àquela encontrada no soro sanguíneo e sofre grandes variações quando comparada em folículos dominantes e subordinados (BENDER et al., 2010).

Quando comparados o líquido folicular e o soro sanguíneo em relação à composição lipídica as diferenças são evidentes, revelando que o líquido folicular

possui uma composição lipídica única (BENDER et al., 2010). Estudos envolvendo gametas e embriões bovinos mostram que o conteúdo lipídico tem capacidade de influenciar, a maturação oocitária, fertilidade e o desenvolvimento embrionário *in vitro* (SOUZA et al., 2003) desempenhando um papel essencial na estrutura e na organização celular nos eventos de sinalização e triagem de macromoléculas (BOU KHALIL et. al., 2010), ou seja, participam efetivamente nas alterações do oócito durante o seu desenvolvimento. Esta participação pode ser observada através do aumento do número de gotas lipídicas quando a dominância folicular é estabelecida (GORDON, 1994), pela contínua deposição lipídica no momento da maturação final (HYTTEL et al., 1997).

Alguns estudos obtiveram sucesso ao correlacionar e identificar moléculas com a qualidade oocitária, tanto no líquido folicular, como nas células da granulosa e células do cumulus (ROBERT et al, 2001;. REVELLI et al, 2009;. ASSIDI et al, 2010). Técnicas como a espectrometria de massas, são utilizadas com frequência para determinação de biomarcadores de maturação oocitária e potencial de desenvolvimento embrionário (FERREIRA et al., 2009).

Utilizando a técnica de espectrometria de massa a composição lipídica de amostras de fluido folicular e células foliculares foram analisadas em relação à capacidade do oócito em maturar, clivar ou gerar blastocisto. Desta forma a hipótese deste estudo é que a composição de lipídios no fluido folicular e nas células presentes em folículos ovarianos está associada com competência oocitária. A determinação desta correlação auxiliará no conhecimento básico sobre condições oferecidas pelos folículos e poderá eventualmente resultar em diagnóstico prematuro da qualidade de oócitos podendo assim gerar uma nova ferramenta para aprimorar os protocolos de fertilização *in vitro*.

1.1. HIPÓTESE

A competência do oócito se desenvolver até o estágio de blastocisto esta relacionada ao perfil lipídico do líquido folicular e das células presentes no ambiente folicular.

1.2. OBJETIVOS

- ✓ Identificar os lipídios e/ou classes lipídicas que compõem o perfil lipídico do líquido folicular bovino e das células foliculares;
- ✓ Encontrar biomarcadores lipídicos relacionados à qualidade oocitária no líquido folicular e/ou nas células presentes no folículo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. OOGÊNÊSE E FOLICULOGÊNESE

Os ovários dos mamíferos são órgãos dinâmicos, sua unidade estrutural e funcional são os folículos ovarianos (LEITÃO et. al., 2009), que têm como função a produção de hormônios e de oócitos (gametas) (PALMA et. al., 2012), através da oogênese - crescimento, capacitação e maturação do oócito (HENNET; COMBELLES, 2012) e da foliculogênese - formação, crescimento e maturação dos folículos (COMBELLES et. al., 2010).

Durante a foliculogênese os folículos são classificados de acordo com o grau de evolução em pré-antrais (primordiais, primários e secundários), e em antrais (terciários e pré-ovulatórios), devido à ausência ou presença, respectivamente, do antro, uma área preenchida por fluido folicular (FIGUEIREDO et al., 2008).

O desenvolvimento de um folículo da fase primordial até se tornar pré-ovulatório, em bovinos, dura aproximadamente 4-6 meses (EVANS et a., 2012). Antes da formação do antro o processo é longo, depende de fatores intrínsecos e possui muitos mecanismos ainda desconhecidos. Após sua formação o desenvolvimento é mais rápido, dependente das gonadotrofinas (principalmente LH e FSH) e também de estrógeno (produzido pelo próprio folículo) (ANTONIOLLI, 2002).

O folículo primordial é formado por um oócito quiescente, em prófase I da meiose e é caracterizado por possuir uma única camada achatada de células pré-granulosa; estes folículos primordiais constituem a reserva do ovário, a partir da qual os folículos são recrutados para o desenvolvimento (AERTS; BOLS, 2010).

A hipótese mais aceita é que ao nascimento os ovários de primatas e animais domésticos contêm um número finito de folículos primordiais, enquanto que em roedores esta reserva ovariana desenvolve nos primeiros dias pós-parto (FORTUNE, 2003). Embora Johnson e seus colaboradores (2004) demonstraram a existência de células-tronco responsáveis pela renovação da reserva folicular pós-natal em ovários de mamíferos.

O início do crescimento dos folículos primordiais é um processo gradual e contínuo, que se inicia logo após sua formação e acontece ao longo da vida reprodutiva (FORTUNE et al., 1998) sendo resultado de uma interação entre fatores endócrinos,

autócrinos e parácrinos. Pouco se conhece sobre o gatilho responsável pelo retorno ao crescimento dos folículos da reserva folicular (OKTEM; OKTAY 2008), mas sabe-se que o desenvolvimento folicular inicial é induzido por alguns fatores secretados pelo oócito como o fator de diferenciação crescimento (GDF9), a proteína morfogenética do osso (ELVIN et al., 2000; KNIGHT; GLISTER, 2003) e o fator de crescimento de fibroblastos (VAN DER HURK; ZHAO, 2005) (NILSSON et al., 2001). Mas, a ativação de folículos primordiais requer também a presença de fatores secretados pelas células da granulosa (NILSSON; SKINNER, 2001) e pelas células da teca (EPPIG, 2001). Portanto, a foliculogênese pode ser desregulada quando um determinado fator ou tipo celular está ausente ou deficiente (EPPIG, 2001).

Uma vez recrutado, o folículo primordial passa a ser folículo primário, e a única camada de células da granulosa que possui se torna cuboidal. Uma característica marcante dessa fase do folículo no desenvolvimento oocitário é o surgimento da zona pelúcida (MANNIKKO et al., 2005). Posteriormente, com o aumento do oócito, a formação da zona pelúcida, as primeiras células da teca e no mínimo duas camadas da granulosa o folículo passa a ser denominado secundário (SENEDA e BORDIGNON, 2007), durante esta fase do folículo, o oócito apresenta intenso crescimento, com marcante síntese de RNA e proteínas, aumento do número de ribossomos, mitocôndrias e reorganização das organelas existentes (HYTTEL et al., 1997).

Com a intensa proliferação das células da granulosa, a formação de uma área preenchida por fluido na camada granulosa e a organização completa das células da teca os folículos são classificados como terciários e já são considerados antrais (BURATINI et al., 2005), neste estágio do desenvolvimento a maioria dos folículos regredem (JAMNONGJIT; HAMMES, 2005). A partir desse estágio, o diâmetro folicular aumenta acentuadamente devido ao crescimento do oócito, a multiplicação das células da granulosa e da teca e ao aumento da cavidade antral (PARROT; SKINNER, 2000).

O crescimento dos folículos antrais, no processo conhecido como seleção folicular, é dependente dos níveis de hormônio folículo-estimulante (FSH). Quando há um aumento da concentração de FSH os folículos responsivos continuam seu crescimento, se desenvolvem e produzem quantidades crescentes de estradiol. À medida que os folículos crescem, a concentração de estradiol produzido aumenta e provoca um *feedback* negativo no FSH fazendo com que suas concentrações diminuam (FAIR, 2003).

Em geral, apenas um folículo consegue continuar seu crescimento tornando-se o folículo dominante, o restante dos folículos antrais regridem e entram em processo de atresia (HENNET; COMBELLES, 2012). No final do seu crescimento, o folículo dominante atinge uma fase de platô, um período de maior diferenciação bioquímica que ocorre antes da ovulação, é nesse período que o oócito sofre a maturação *in vivo*. Após o pico de LH, este folículo muda a sua atividade hormonal, substituindo a produção de estradiol por progesterona (REVELLI et al., 2009).

O microambiente oocitário, formado pelo folículo antral, é responsável pela integridade dos processos e a produção de um oócito de alta qualidade. Os componentes do folículo antral, incluindo três tipos distintos de células somáticas (células da teca, da granulosa e do cumulus), a lâmina basal, e o fluido folicular têm papéis ativos na diferenciação e regulação do oócito, além de influenciar sobre o seu desenvolvimento (COMBELLES et al., 2010). A maior parte do crescimento dos oócitos ocorre antes da foliculogênese antral, mas eles ainda crescem após a formação do antro, e somente completam seu desenvolvimento quando o folículo atinge, em média 3 mm de diâmetro, no caso da espécie bovina (FAIR, 2003).

Além de ser influenciado pelo microambiente do folículo, o oócito também contribui ativamente para o processo de desenvolvimento folicular, possivelmente com a função de orquestrar a foliculogênese. A indicação principal para o papel central do oócito na formação de folículos é que este processo parece ser coordenado pelo fator de transcrição de linha germinativa (FIGLA), expresso pelos oócitos (SOYAL et. al., 2000). Em seus estudos, Eppig e seus colaboradores (2002) observaram que folículos primordiais, que receberam oócitos provenientes de folículos secundários, assumiram características de secundários como diferenciação de células da granulosa e duplicação das taxas de desenvolvimento.

Fica, então, evidente a relação de dependência entre o desenvolvimento dos oócitos e seus folículos e isso representa uma dificuldade para a mimetização deste ambiente *in vitro*. Para aperfeiçoar as tecnologias de reprodução assistida é necessário entender como, quando e por que o oócito induz alterações no ambiente folicular e tentar reproduzir ou oferecer *in vitro* os componentes presentes no microambiente folicular (HENNET; HOPE; COMBELLES, 2013).

2.2. COMPETÊNCIA OOCITÁRIA

A competência oocitária é definida como a habilidade ou potencial de um oócito passar pela maturação, ser fecundado, desenvolver-se até o estágio de blastocisto e manter a gestação (PORCIUNCULA, 2007). Está relacionada à mudanças que ocorrem no oócito, nas células que estão em contato com ele e também nas células do folículo (BLONDIN et al., 1997), e é progressivamente adquirida durante o crescimento folicular (MERMILLOD et al., 2000; COTICCHIO et al., 2004). A competência oocitária envolve uma série de eventos, entre eles a maturação nuclear (com a retomada da meiose) e citoplasmática (com alterações moleculares e estruturais) (BEVERS et al., 1997).

O crescimento oocitário permite que o oócito termine a meiose, tenha uma fecundação monospérmica e passe dos estágios iniciais de desenvolvimento até a ativação do genoma embrionário. Por fim o crescimento oocitário pode ainda ser determinado por fatores diversos como tamanho folicular, dia do ciclo estral, nível de atresia e influência de folículos vizinhos (COTICCHIO et al., 2004).

Os eventos citoplasmáticos envolvidos na maturação e a sincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática são essenciais para a capacitação do oócito. A competência meiótica, ou seja, a habilidade do oócito em reiniciar a maturação nuclear é obtida no final da fase de desenvolvimento, o que não obrigatoriamente lhe garante o potencial de viabilidade ou de nascimento (ALI e SIRARD, 2005).

O ambiente folicular inibe a maturação espontânea do oócito e esse bloqueio é mantido pela proteína G estimulatória (Gs) (MEHLMANN et al., 2002). *In vivo*, apenas quando os oócitos de mamíferos completam seu crescimento, através de sinais das células somáticas, que eles reiniciam a meiose, completando a primeira divisão meiótica e progredindo até o estágio de metáfase II (MII) da segunda divisão (GOSDEN; LEE, 2010). Mas nas condições *in vitro*, quando os oócitos são retirados do seu ambiente folicular, automaticamente o processo de maturação é iniciado, mesmo que antes do seu completo desenvolvimento (MEHLMANN et al., 2002).

De acordo com Hennet e Combelles (2012) cada tipo de célula folicular é parcialmente responsável pela maturação e competência do oócito. As células do cumulus, que estão intimamente ligadas com o oócito no complexo cumulus-oócito, fornecem ajuda metabólica essencial e participam da sinalização parácrina entre todos

os tipos de células, incluindo as células da granulosa e as células da teca; sinalização esta que é a chave para regular a progressão da meiose. Além disso, a tradução dos mRNAs, que são essenciais para reprogramar o oócito para o desenvolvimento do embrião, depende de sinais de células somáticas (CHEN et al., 2013). Grande parte desta interação é guiada pelo oócito, e, consequentemente, muitos estudos têm sugerido que a saúde e a funcionalidade das células foliculares somáticas é um reflexo da saúde e da competência de oócitos, e vice-versa (HENNET; COMBELLES, 2012).

O tamanho oócito é um fator limitante na aquisição da competência, uma vez que oócitos pequenos ($<60\mu\text{m}$) não são capazes de reiniciar a meiose quando removidos de seus folículos e cultivados *in vitro* (JONES, 2004). Otoi et al. (1997) observaram que os oócitos bovinos adquirem competência meiótica com $115\mu\text{m}$ de diâmetro, mas a completa competência para o desenvolvimento só ocorre quando chegam a um diâmetro de $120\mu\text{m}$.

Assim como o tamanho dos oócitos, o tamanho dos folículos também tem relação com a capacidade oocitária. Em bovinos, oócitos de folículos com maior diâmetro possuem maior potencial de desenvolvimento (CAIXETA et al., 2009), e oócitos de folículos menores que 02 mm de diâmetro além de possuírem menor taxa de maturação, possuem maior suscetibilidade a anomalias de fertilização quando comparados com folículos de diâmetros maiores (YANG et al., 1998).

Diferentemente da maturação *in vivo*, os oócitos maturados *in vitro* frequentemente têm seu metabolismo alterado e um potencial de desenvolvimento reduzido (CHAVES et al., 2010). Podendo ser consequência de deficiências no meio de maturação, pois a regulação da disponibilidade de nutrientes e de enzimas pode ocorrer em níveis diferentes (KRISHER, 2004). Sendo assim, o cultivo de folículos pré-antrais pode apresentar vantagens, provocando alterações significativas no microambiente do folículo e do oócito antes e durante os processos de maturação. Além disso, o cultivo também pode ser útil para explorar as diferentes respostas do oócito e das células somáticas do folículo quando submetidos a diferentes ambientes e concentrações de moléculas e fatores (SUN et al., 2004).

Oócitos de boa qualidade são pré-requisito para muitas aplicações, tanto clínicas como agrícolas por isso existe a necessidade de identificar e compreender as alterações celulares e moleculares que influenciam a integridade do oócito e do folículo durante a foliculogênese (COMBELLES et al., 2010). Muitos estudos têm avaliado as diferentes

características foliculares, que podem estar associadas com o aumento da competência oocitária, pois os baixos resultados da produção *in vitro* (PIV) podem ser, seguramente atribuídos as falhas nas condições de cultivo *in vitro* (RUSSEL et al., 2006) e a qualidade dos oócitos selecionados (CAMARGO et al., 2006).

Como o potencial de desenvolvimento do oócito é determinado por múltiplos fatores, há uma necessidade urgente de procedimentos não invasivos para a avaliação da prévia de sua qualidade mais fidedigna do que seu aspecto morfológico (GOOVAERTS et al., 2010). Novas tecnologias, como a transcriptômica, proteômica e metabolômica, permitem que os pesquisadores e clínicos investiguem métodos mais sofisticados para a seleção de oócitos e embriões, com ênfase no valor preditivo de fluidos e tecidos supérfluos, tais como fluido folicular, as células foliculares e células do cumulus (REVELLI et al., 2009).

2.3. MATURAÇÃO OOCITÁRIA

A maturação do oócito inclui todos os eventos necessários para que o gameta feminino possa expressar seu potencial de desenvolvimento após a fecundação. É uma das fases mais importantes da produção *in vitro* de embriões, pois, quando a maturação do oócito é inadequada, seja no núcleo ou no citoplasma, sua fecundação é inviabilizada, aumentando a ocorrência de polispermia e causando o bloqueio do desenvolvimento embrionário (XU e BRACKET, 1988). O indicador mais factual da completa maturação nuclear e citoplasmática, observado em laboratório, é a capacidade do oócito de ser fecundado e se desenvolver até o estágio de blastocisto eclodido (GONÇALVES et al., 2008).

A maturação *in vivo* do oócito tem início logo após o pico ovulatório de LH quando o oócito retoma a meiose e, *in vitro*, espontaneamente, com a retirada do oócito do seu folículo, quando o efeito inibidor exercido pelas células foliculares cessa (DE BEM, 2009). Durante a maturação o oócito passa da fase de prófase I da meiose até o estágio de metáfase II. A maioria das fêmeas dos mamíferos ovulam oócitos em metáfase II (MII) e eles permanecem nessa fase da meiose até que ocorra a ativação induzida pelo espermatozóide ou por estímulo artificial (KUPKER et al., 1998). A capacidade de oócitos mamíferos em maturar *in vitro* esta correlacionada com a atividade ovariana, crescimento folicular e a presença ou ausência de células do

cumulus, formando o complexo *cumulus*-oócito (COC), necessário para o transporte de energia e promoção da maturação no oócito (TETZNER, 2011).

O processo de maturação em si consiste em uma complexa sequência de eventos nucleares e citoplasmáticos (FISSORE et al., 2002). Entre estas estão inúmeras modificações estruturais e moleculares no citoplasma (maturação citoplasmática) que culminam com a configuração cromossômica em metáfase II (maturação nuclear) precedendo a penetração do espermatozoide e sua ativação para fecundação (ROTH e HANSEN, 2005).

Os eventos nucleares incluem: quebra da vesícula germinativa, desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico (MEINECKE et al., 2001). Os eventos citoplasmáticos incluem: síntese de proteínas (SIRARD et al., 1998), modificações moleculares (KUBELKA et al., 2000), redistribuição das organelas intracelulares (STOJKOVIC et al., 2001) e maturação dos mecanismos de liberação do Ca^{2+} (WANG et al., 2003). Evidências indicam que condições de cultivo adequadas suportam a maturação nuclear, mas frequentemente não conseguem sustentar a maturação citoplasmática (COMBELLES et al., 2010).

No momento em que o oócito é retirado do folículo ele automaticamente reinicia o processo de meiose, prejudicando a coordenação e a conclusão dos processos de diferenciação. Estratégias *in vitro* para inibir o avanço, não fisiológico, da meiose não são muito eficientes, pois, não mimetizam a influência e a comunicação com as células do cumulus e com os outros componentes foliculares (GILCHRIST, 2011).

Os meios de cultura e suas suplementações são fundamentais no sistema de maturação *in vitro* e as baixas taxas são determinadas por fatores ambientais e inerentes ao próprio sistema de produção de embriões (GOTTARDI E MINGOTI, 2009). A remoção do oócito do ambiente folicular, com consequente perda da interação morfológica, hormonal e molecular entre oócito e células foliculares e a soma desses fatores determina o prejuízo na qualidade e competência oocitária, levando à baixa produção de blastocistos (GOTTARDI E MINGOTI, 2009).

Nutrientes, atmosfera, osmolaridade e pH são fatores que devem ser bem controlados durante o cultivo *in vitro*, tentando sempre seguir as características mais próximas possíveis do ambiente folicular *in vivo* (GORDON, 1994). O meio mais

utilizado na maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos é o “Tissue Culture Medium” 199 (TCM-199), existindo poucos relatos que sugerem que outro meio possa ser mais apropriado.

Vários suplementos são adicionados aos meios e os efeitos moleculares que justificam a influência destes suplementos não estão completamente esclarecidos (CARNEIRO et al., 2001). Muitas substâncias como os fatores de crescimento, as gonadotrofinas, os suplementados de soro sanguíneo específico e diferentes condições de cultivo revelaram algum efeito nas taxas de produção e na qualidade embrionária, porém nunca ao ponto de todos os oócitos responderem a estas condições (SIRARD et al., 1998). Por essa razão, é evidente que as condições de cultivo tenham efeitos significativos em permitir ao oócito expressar seu potencial, mas os constituintes originais do oócito controlam a sua habilidade de responder às melhores condições (SIRARD, 2001).

As fontes protéicas mais comumente utilizadas como suplemento do meio de cultura para PIV e embriões bovinos são o soro fetal bovino e a albumina sérica bovina (MINGOTI et al., 2002). No entanto, vários estudos demonstraram a desvantagem da utilização de fontes de origem animal nos meios de PIV, pois esses podem ser veículos para agentes infecciosos e tóxicos para o embrião (GARDNER, 1994; THOMPSON et al., 1995). Ainda entre outras desvantagens, observa-se que geralmente embriões cultivados com soro contêm grandes quantidades de lipídios em comparação com embriões produzidos *in vivo*, o que aumenta a sensibilidade à criopreservação (ABE et al., 2002; GÓMEZ et al., 2008).

Rotineiramente também são adicionados aos meios de maturação os hormônios LH e FSH, os quais promovem melhora na expansão das células do cumulus facilitando a fertilização e o FSH também estimula a produção de substâncias sinalizadoras pelas células somáticas, que induzem à retomada da meiose (YOUNIS e BRACKETT, 1992).

Além da utilização de substâncias reconhecidamente reguladoras da maturação nuclear de oócitos em mamíferos, outros componentes que também estão envolvidos no processo de foliculogênese como o fluido folicular e o co-cultivo com células da granulosa (CARNEIRO, 2007).

O pH das soluções e do fluido celular é crítico para a eficiência de muitos eventos e reações bioquímicas que envolvem o equilíbrio ácido-básico e, devido a isto, influencia a produção de blastocistos (GOTTARDI e MINGOTI, 2009). Variações de pH no meio de cultivo, dependendo da amplitude, podem resultar em diminuição dos

índices de fecundação e produção de blastocistos, já que a viabilidade celular é afetada. Normalmente, a maturação *in vitro* é realizada em 5% CO₂ em ar atmosférico, utilizando-se meio tamponado com bicarbonato de sódio para manutenção do pH em 7,4 (GOTTARDI e MINGOTI, 2009).

A exposição de oócitos a temperaturas muito baixas ou elevadas (i.e. choque térmico) na fase de vesícula germinal (PAYTON et al., 2004), ou durante a fase inicial de maturação (ROTH e HANSEN, 2004), interfere no processo de maturação (ROTH e HANSEN, 2005) devido a alterações que ocorrem no citoesqueleto (SHIN e KIM, 2003).

O estoque de transcritos e proteínas no citoplasma do oócito é de fundamental importância para o processo de maturação e, principalmente, para assegurar o desenvolvimento embrionário inicial até o estágio de oito células (bovinos), período em que genoma embrionário é ativado e que a síntese de novas proteínas torna-se necessária (FERREIRA *et al.*, 2009). Essa fase é denominada transição materno-zigótica e a expressão de certos genes durante esse período determinará o sucesso da embriogênese nas etapas pré-implantação (MEIRELLES *et al.*, 2004).

Segundo Gottardi e Mingoti (2009), as pesquisas realizadas com o objetivo de aumentar a eficiência do desenvolvimento de oócitos cultivados *in vitro* têm recebido dois principais enfoques: a adição de substâncias promotoras de crescimento ao meio de maturação e a tentativa de simulação das condições intrafoliculares. O entendimento das particularidades da fisiologia, a adição de hormônios e os fatores de crescimento específicos nos meios de cultivo proporcionaram avanços na MIV em mamíferos (CHAVES et al., 2010). Mas as razões para as falhas dos oócitos de ruminantes em completar a meiose *in vitro* não foram totalmente determinadas.

2.4. LÍQUIDO FOLICULAR

O líquido folicular, também denominado de fluido folicular, é o líquido presente no antro folicular. É formado a partir da corrente sanguínea e da secreção das células somáticas no interior do folículo (FORTUNE, 2004; REVELLI et al., 2009), contém uma grande variedade de moléculas, incluindo proteínas e hormônios, fatores anti-coagulantes, fatores de crescimento, açúcares, espécies reativas de oxigênio, eletrólitos entre outros (REVELLI et al., 2009). Este líquido banha o oócito e faz a mediação da

comunicação entre os vários tipos celulares presentes no folículo (HENNET; COMBELLES, 2012).

Sabe-se que a composição do líquido folicular tem influencia na capacidade de desenvolvimento do oócito. Esta afirmativa baseia-se principalmente em alguns componentes do fluido folicular que têm significativa importância na diferenciação do oócito como: espécies reativas de oxigênio e antioxidantes, hormônios e metabólitos (HENNET; COMBELLES, 2012). O equilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ROS) e os antioxidantes no fluido folicular é essencial, pois em níveis baixos, as ROS são importantes para as funções celulares e vias de sinalização; e, em níveis excessivos as ROS podem causar aberrações na organização dos microtúbulos, no alinhamento dos fusos cromossômicos da metáfase II em oócitos de camundongos *in vitro* (CHOI et al., 2007), e inibir a maturação em oócitos de ratas (TAMURA et al., 2008).

As concentrações de hormônios no líquido folicular influenciam a diferenciação do oócito direta (via ação genômica e não-genômica) e indiretamente (através de células somáticas dentro do folículo). Em humanos, os principais hormônios presentes no líquido folicular são FSH, LH, hormônio de crescimento (GH), gonadotrofina coriônica humana (hCG), progesterona e estradiol; e as concentrações elevadas de hCG, FSH e LH parecem beneficiar a maturação de oócitos e correlacionam-se com uma elevada probabilidade de fertilização (HENNET; COMBELLES, 2012). Altos níveis de estradiol, especialmente em relação aos níveis de andrógenos também estão associados com alta qualidade de oócitos e folículos saudáveis (REVELLI et al., 2009).

Os metabólitos presentes no líquido folicular se acumulam dentro do oócito e fornecem os componentes intracelulares necessários para a diferenciação oocitária, entre esse metabólitos estão os aminoácidos, os lipídios, os nucleotídeos e outras pequenas moléculas, os quais são oriundas tanto do soro como da atividade metabólica das células somáticas foliculares (HENNET; COMBELLES, 2012).

De acordo com Bender et. al. (2010) a composição dos metabolitos do fluido folicular de vacas é significativamente diferente quando comparado com o líquido folicular das novilhas, e também quando comparada entre folículos subordinados e o dominante. Em seus estudos pelo menos 37 ácidos graxos já foram identificados no fluido folicular dos bovinos e estão entre os mais abundantes o ácido linoleico, ácido oleico, ácido esteárico e ácido palmítico. Sinclair et. al. (2008) observaram diferenças significativas nas concentrações de ácidos graxos saturados em oócitos competentes e degenerados.

Quando comparado o perfil de ácidos graxos entre o soro e o fluido folicular, observou-se que a composição do fluido folicular é única, e que não é um simples reflexo do perfil desses componentes no soro (BENDER et al., 2010). O líquido folicular e o soro sanguíneo também possuem concentrações distintas com relação aos aminoácidos, pois, a maioria dos os aminoácidos essenciais e não essenciais apresentam concentrações mais baixas no líquido folicular de folículos pré-ovulatórios do que no plasma, com a exceção do glutamato, que a concentração é três vezes mais elevada no líquido folicular do que no plasma (JOZWIK et al., 2006).

Os três tipos de células somáticas presentes no ambiente folicular, ou seja, as células da granulosa, as células da teca e as células do cumulus também influenciam nas concentrações do líquido folicular, pois secretam uma variedade de moléculas que incluem proteínas e fatores de crescimento, os quais têm efeitos sob o oócito, na regulação e na retomada da meiose (HENNET; COMBELES, 2012). A composição do fluido folicular é um possível e importante indicativo de qualidade oocitária e embrionária, pois reflete todo o metabolismo folicular e contém moléculas reguladoras que são cruciais para o sucesso da maturação dos oócitos (WALLACE et al., 2012).

A análise do ambiente folicular é um passo lógico no desenvolvimento de métodos não invasivos para a seleção de oócitos e embriões. Como o fluido folicular é um subproduto da recuperação de oócitos, na rotina, torna-se a amostra ideal para esses estudos. A identificação de biomarcadores e explicações plausíveis para as alterações na composição de metabólitos irão possibilitar a identificação e a padronização de um método não invasivo de qualidade oocitária (WALLACE et al., 2012).

2.5. OS LIPÍDIOS NO DESENVOLVIMENTO E NA QUALIDADE OOCITÁRIA

Os lipídios desempenham um papel essencial na estrutura e na organização celular, nos eventos de sinalização e tráfico, e na triagem de macromoléculas (BOU KHALIL et. al., 2010), ou seja, participam ativamente das alterações do oócito durante o seu desenvolvimento. Participação esta que pode ser observada através do aumento do número de gotas lipídicas quando a dominância folicular é estabelecida (GORDON, 1994) e também pela contínua deposição lipídica no momento da maturação final (HYTTEL, 1997).

Durante o crescimento e a maturação oocitária, os lipídios do fluido folicular acumulam dentro do oócito e constituem uma reserva para o desenvolvimento embrionário futuro (HAGGARTY et al., 2006). Na maturação, os lipídios podem ser usados como uma fonte de energia, pois, a atividade da enzima lipase permanece constante (CETICA et. al., 2002) e os estoques de triglicérides e colesterol são reduzidos (FERGUSON; LEESE, 1999; KIM et. al., 2001). Da mesma forma, durante a fertilização, pois, os estoques de lipídios são reduzidos do momento da fertilização até a formação do embrião de duas células (FERGUSON; LEESE, 1999).

De acordo com Bender et al. (2010), estudos com gametas e embriões de mamíferos provaram que o teor de lipídios tem capacidade de influenciar a maturação oocitária, fertilidade e o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Além disso, os lipídios juntamente com os ácidos graxos são contribuintes essenciais para a integridade estrutural, funcional e metabólica do embrião pré-implantação (BENDER et al., 2010).

Em oócitos bovinos, suínos e ovinos, os ácidos graxos (FA – “*fatty acids*”) predominantemente encontrados foram os ácidos palmítico, esteárico e oléico, suas proporções variaram entre as espécies e diferenças espécies-específicas também foram observadas para ácidos graxos polisaturados (MCEVOY et al., 2000). O ácido palmítico foi o FA mais abundante em todos os oócitos bovinos, ácido oléico foi o segundo tipo mais comum em oócitos de melhor qualidade e ácido esteárico foi o segundo mais comum em oócitos classificados como sendo de qualidade inferior (KIM et al., 2001).

Em seus estudos, Marei et al. (2010) observou que as concentrações de ácido linoleico diminuem à medida que o tamanho do folículo aumenta e a exposição experimental, de COC's a este ácido graxo inibiu a expansão das células do cumulus e diminuiu do número de oócitos em metafase II. Mas, seus efeitos foram dose-dependentes e provocaram pequenas alterações em mecanismos moleculares que regulam a maturação do oócito (MAREI et al., 2010). Segundo Bender et. al. (2010) a concentração de 11 ácidos graxos no fluido folicular dos folículos subordinados foram significativamente menores quando comparadas com o folículo dominante, entre eles ácido linolênico, ácido araquidônico, ácido eicosatrienoico.

Os triglicerídeos (TAG) são a principal classe lipídica presente no citoplasma das células de mamífero como gotículas lipídicas e constituem uma fonte de energia para oócitos e embriões (STURMEY et al., 2009). Ferreira et. al. (2012) verificaram através do perfil dos TAG que eles estão pouco presentes no oócitos imaturos, mas aumentam em quantidade nos oócitos maturados e aparecem claramente nos embriões.

Os fosfolípidos (PL) são os mais abundantes nas membranas das células eucarióticas, e o seu papel na criopreservação bem sucedida permanece pouco compreendido (VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2008).

O conhecimento da composição lipídica do líquido folicular é importante devido a sua influência na maturação e no potencial de desenvolvimento do oócito e do embrião (SOUZA, 2003). Há evidências de que os níveis de gotículas lipídicas citoplasmáticas estão associadas à redução sobrevivência embrionária pós-criopreservação (SUDANO et al., 2012). A lipidômica, o estudo em larga escala de lípidos celulares, é uma alternativa, pois, é um campo de pesquisa relativamente recente e promissor, e é caracterizado por avanços rápidos e tecnológicos pois, permite o reconhecimento e a análise detalhada dessas moléculas (FAHY et. al., 2011).

2.6. ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA

O oócito possui o poder de programar seu núcleo e começar o desenvolvimento embrionário, algumas vezes mesmo sem a participação do espermatozóide, como na ativação partenogenética (PALMA et. al., 2012). A partenogênese é definida como a produção de um embrião, com ou sem o eventual desenvolvimento de um indivíduo, a partir de um gameta feminino sem a contribuição do gameta masculino (BEATTY, 1957).

Após a ovulação, os oócitos bovinos, têm um curto período de tempo para serem ativados, seja pelo espermatozóide, que é o ativador natural do oócito ou artificialmente, pela ativação partenogenética (KUPKER et al., 1998). Assim que acontece a fusão do espermatozóide com o oócito, na ativação natural, ocorre uma cascata de eventos que culminam com a formação do IP₃ (inositol trifosfato) que desempenha a função de estimular a liberação de Ca²⁺ no interior do oócito (HAJNÓCZKY et al., 2003). Com as oscilações intracelulares de Ca²⁺ iniciam-se eventos no interior dos oócitos que são imprescindíveis para o posterior desenvolvimento embrionário, como por exemplo, a diminuição do MPF (fator promotor da maturação) (KIKUCHI et al., 2000). O significado biológico dessas oscilações não é bem conhecido, mas sabe-se que os íons Ca²⁺ estão envolvidos na exocitose dos grânulos corticais e no controle da progressão do ciclo celular (KLINE e KLINE, 1990; MIYAZAKI, 1990; GRUPEN et al., 2002).

É possível induzir essa ativação, *in vitro*, aumentando os níveis intracelulares de cálcio através de agentes físicos, como eletrochoques, injeção intracelular de CaCl_2 ou através de agentes químicos, como ionomicina, etanol, ciclohexamida, estrôncio e 6-dimetilaminopurina (NUSSBAUM; PRATHER, 1995). O envelhecimento do oócito facilita a resposta à ativação, mas compromete o desenvolvimento embrionário, pois, além da diminuição do fator promotor de metáfase, ocorre degradação da reserva de mRNA e proteínas maternas (COLLAS et al., 1993;1995; ALBERTINI, 2003). Um único estímulo pode ser capaz de inativar o MPF, o que implica na retomada da meiose, extrusão do segundo corpúsculo polar e formação dos pró-núcleos (PORCIUNCULA, 2007).

Existem diversas limitações no processo de indução da ativação, como a dependência do tempo de maturação, idade dos oócitos (BARNES et al., 1993) e estímulos insuficientes. Por exemplo, quando o estímulo é insuficiente, não ocorre inativação da proteína kinase ativada por mitógeno e os níveis de MPF são restabelecidos (KIKUCHI et al., 2000), consequentemente, os eventos posteriores, como recrutamento de mRNA, formação de pró-núcleo, síntese de DNA e clivagem não ocorrem de maneira coordenada (MÉO, 2004).

A ativação partenogenética é uma valiosa ferramenta laboratorial para avaliar o real potencial de desenvolvimento do oócito até o estágio de blastocisto, pois não há interferência de fatores ligados ao espermatozoide (DE SOUSA et al., 2002; LIU; AOKI, 2002).

2.7. CULTIVO OOCITÁRIO E EMBRIONÁRIO INDIVIDUAL

Na rotina de produção de embriões *in vitro* (PIV), tanto experimentalmente como comercialmente, o cultivo de oócitos e embriões é feito em grupos (GOOVAERTS et al., 2009). Embriões pré-implantação cultivados em grupos possuem melhores taxas de desenvolvimento (GOOVAERTS et al., 2010) por, principalmente, duas razões: ausência de estimulação autócrina e parácrina por oócitos ou embriões vizinhos comprometendo a capacidade de desenvolvimento (MATOBA; FAIR; LONERGAN, 2010); e a manipulação, de oócitos e embriões, individualmente é trabalhosa e demorada.

A produção e o cultivo individual possuem vantagens que incluem a capacidade de rastrear e monitorar os embriões individuais (estudos retrospectivos), coleta de dados

mais específicos com parâmetros adicionais, melhor avaliação embrionária individual para o sucesso da implantação, avaliação e monitoramento do secretoma de oócitos ou embriões individuais, estudos de biomarcadores de viabilidade e qualidade entre outros (KRISHER; WHEELER, 2009).

Alternativas como a Cell-Tak, WOW (*Well-of-the-Well*) ou sistemas de cultura de malha oferecem a vantagem de melhores resultados quando comparados aos sistemas tradicionais, permitindo o isolamento e, por conseguinte, a identificação de oócitos e embriões individuais durante todo o período de desenvolvimento (MATOBA; FAIR; LONERGAN, 2010). A dissecação do folículo e a cultura individual em Cell-Tak não afetam a taxa de clivagem ou a taxa de formação de blastocistos (MATOBA et al., 2013)

Outros protocolos têm sido testados, entre eles a co-cultura com células do cumulus que pode aumentar a produção de blastocistos, por neutralizar os efeitos negativos do cultivo individual, atingindo taxas semelhantes às obtidas em culturas em grupo, mas é igualmente importante otimizar também a maturação oocitária e a fertilização individual (GOOVAERTS et al., 2009). Em co-cultura com células do cumulus, 24% blastocistos foram obtidos com protocolo de produção completamente individual (maturação, fertilização e cultura), a qualidade do embrião e os perfis de expressão gênica não diferem entre os embriões produzidos em grupos e individualmente (GOOVAERTS et al., 2011). Segundo Govaerts et al. (2012) quando desenvolvimento a blastocisto precisa ser isolado, a utilização de células do cumulus é um método eficiente e robusto e proporciona boas taxas de blastocistos.

Para melhorar o desenvolvimento individual, foram testadas modificações nos meios de cultura (progesterona, soro fetal bovino (SFB), albumina sérica bovina (BSA)), composição da atmosfera de gás, tamanho de gota, volume e área sob óleo, e, também modificações do ambiente físico (GOOVAERTS et al., 2012) pois, a otimização da produção *in vitro* individual de embriões é interessante para revelar mais informações sobre os requisitos necessários ao oócito e ao embrião para expressarem sua capacidade ao desenvolvimento (GOOVAERTS et al., 2010).

2.8. ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS) E LIPIDÔMICA

O espectrômetro de massas (MS) é um instrumento que sujeita moléculas a um feixe de elétrons de alta energia; possui cinco compartimentos: unidade de entrada da amostra, fonte de ionização, analisador de massa, detector e sistema de dados. Seu produto final é o espectro de massa – um gráfico do número de íons detectados como uma função da razão m/z (PAVIA et. al. 2010). O espectrômetro de massa pode ser usado, também, em modo de verificação (MS) para proporcionar informações sobre massas moleculares precursoras dentro de uma gama especificada de massa. A análise em conjunto (MS / MS) fornece informações complementares e em maior número (HARKEWICZ; DENNIS, 2011).

Através da espectrometria de massas é possível determinar a massa molecular e quantificar biomoléculas como proteínas, carboidratos, lipídeos e oligonucleotídeos; com sua utilização, incríveis avanços nos estudos biológicos foram observados nas áreas de genômica, transcriptômica, metabolômica, proteômica e lipidômica (FERREIRA et al., 2009). De todas as moléculas contidas no metabolismo, os lipídios representam o maior subgrupo existente nas células e tecidos.

Conhecida como lipidômica, uma parte dominante da metabolômica, é a análise e caracterização global, tanto espacial e temporal, da estrutura e da função lipídica dentro de um sistema vivo (HARKEWICZ; DENNIS, 2011). As vias lipídicas desempenham papéis biológicos fundamentais dos mamíferos em embriologia pré-implantacional, controlando vias de desenvolvimento precoce em termos de destino e diferenciação celular (IKONOMOV et al., 2011), também em gametas e embriões de mamíferos onde a composição de ácidos graxos influencia diretamente na maturação oocitária, na fertilidade e no desenvolvimento embrionário *in vitro* (KIM et. al., 2001).

A análise dos lipídios constitui um desafio constante devido à grande quantidade e diversidade estrutural. Estima-se que o número teórico de isoformas distintas lipídicas é cerca de 200.000 (ORESIC, HANNINEN, E VIDAL-PUIG, 2008; YETUKURI et al, 2008). A espectrometria de massas oferece uma alta sensibilidade e representa uma solução para a caracterização dos perfis lipídicos em uma célula ou organismo (MURPHY et al., 2005). A MS tem feito significativo avanço em lipidômica e, várias formas de ionização podem ser utilizadas dependendo do objetivo e dos lipídios a serem detectados (PAVIA et al., 2010).

Na biotecnologia da reprodução a espectrometria tem sido amplamente aplicada, como por exemplo, no controle e qualidade de meios utilizados na produção *in vitro* de embriões (PIVE), em lipidoma de oócitos e de embriões e em estudos de composição de soro fetal bovino (FERREIRA et al., 2009) pois, conhecer a composição lipídica de meios de cultivo, do líquido folicular, dos oócitos e dos embriões será um grande avanço para entender as diferenças nos índices de desenvolvimento *in vivo* e *in vitro*, tanto oocitário como embrionário.

A espectrometria de massa, em geral, é a técnica de escolha para caracterizar estruturas lipídicas, quantificar lipídios abundantes em misturas complexas e também identificar determinados lipídios-alvo, presentes em baixas concentrações, que são gerados pelo metabolismo celular. A compreensão e identificação dos componentes lipídicos dentro e fora da célula vai melhorar o entendimento da biologia celular e da natureza integrada de lipídios, proteínas e genes nos processos bioquímicos (MURPHY et al., 2005).

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Legenda:

Foram utilizados 04 (quatro) ovários por rotina, e de cada um deles selecionados 5 (cinco) folículos, com diâmetro entre 3 e 6mm. Os ovários e folículos foram identificados e os oócitos foram classificados e colocados em maturação *in vitro* pelo período de 26 horas, os quais foram desnudados e avaliados quanto à presença do primeiro corpúsculo polar com 19 horas de maturação. O líquido folicular foi coletado e em seguida centrifugado (600g por 8 minutos) para separação dos componentes celulares e do líquido folicular. Foram estocados o líquido folicular, a parede folicular, o

pellet celular e os blastocistos produzidos, fixados em paraformaldeído 4% e/ou congelados. Os oócitos, maturados ou não, foram submetidos à ativação partenogenética, individualmente. Após ativação os partenotos foram cultivados, individualmente, em meio SOF por 8 dias. Sendo a taxa clivagem avaliada no terceiro dia (D3) após ativação e a taxa de blastocistos no sétimo e oitavo dia após ativação (D7 e D8). Reconhecido o potencial individual de cada oócito, as amostras armazenadas de líquido folicular e de células do folículo foram separados em grupos relacionados com o estágio em que o desenvolvimento oocitário foi interrompido – Não Clivados, Clivados e Blastocistos. Os líquidos foliculares e as células analisadas foram submetidos a protocolo de extração de lipídios e as análises foram feitas por espectrometria de massas, MALDI ou LC-MS/MS.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os reagentes e meios de cultivo utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA) quando não for o caso, será informada a origem. Os experimentos foram desenvolvidos de acordo com o International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (Society for the Study of Reproduction).

4.1. Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) no Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo – Campus de Pirassununga. As aplicações e avaliações da técnica para determinar o perfil lipídico foram desenvolvidas em colaboração com Dr. Edson Guimarães Lo Turco (Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP), Prof. Dr. Carlos Alberto Labate (Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ) e Dra. Christina Ramires Ferreira (Purdue University).

4.2. Coleta dos ovários, folículos e oócitos

Foram utilizados ovários de bovinos abatidos em frigoríficos na região de Pirassununga – SP. Os ovários foram transportados ao laboratório em garrafas térmicas com solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) na temperatura de aproximadamente 26°C, em intervalo de até 3 horas após o abate.

No laboratório os ovários foram lavados em solução fisiológica estéril e armazenados em Becker com a mesma solução. Por rotina, quatro ovários foram escolhidos aleatoriamente e de cada um deles cinco folículos, com diâmetro variando de 3 a 6 mm, foram dissecados individualmente, com o objetivo de deixar a menor quantidade possível de tecido ovariano, utilizando tesoura e bisturi. Os folículos, provenientes de um mesmo ovário, foram agrupados e colocados em placas de *Petri* (60 mm), previamente numeradas, com solução salina estéril (NaCl 0,9%) até serem levados ao microscópio estereoscópico (Figura 1)..

Com agulhas 18-G os folículos foram ordenadamente rompidos e, assim que localizados, os oócitos foram classificados e transferidos (Figura 2), individualmente, para gotas de 20µl de meio para lavagem - Tissue Culture Medium-199 (TCM-199; GIBCO BRL) tamponado com HEPES e suplementado com 10% SFB, 0,2 mM de piruvato de sódio e 83,4 µg/ml de sulfato de amicacina.

A classificação dos oócitos foi feita de acordo com a quantidade de células do *cumulus* e a qualidade morfológica intracelular em Grau I (GI), Grau II (GII), Grau III (GIII) ou Grau IV (GIV). Oócitos foram considerados GI quando possuíam mais de 3 camadas compactas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo, GII quando tinham de 2 a 3 camadas de células do *cumulus* compactas e citoplasma homogêneo, podendo apresentar granulações no citoplasma, GIII quando as células do *cumulus* do oócito estavam expandidas, com citoplasma contraído, fragmentado ou apresentando vacúolos e GIV na ausência de células do *cumulus* e /ou degenerado.

Imediatamente após a identificação e separação do oócito, o líquido folicular (em média 15 µl) foi coletado e armazenado em tubos tipo eppendorf (0,6 ml), e posteriormente centrifugado a 600g por 8 minutos, para purificação, por separação do sobrenadante com pipeta automática.

Ambos, líquido folicular e *pellet* de células foliculares foram armazenados em freezer -80°C, para posterior análise. Após a coleta do líquido folicular a parede do folículo também foi armazenada em freezer-80°C, em tubos tipo eppendorf (0,6 ou 0,2 ml).

Figura 5. Fotomacrografias do procedimento de dissecação do folículo ovariano. Em (A) os instrumentos cirúrgicos utilizados, em (B) o folículo sendo separado do ovário, em (C) um folículo sendo dissecado e em (D) os folículos dissecados separados de acordo com o ovário de origem, em placa de Petri de 60mm.

Figura 6. Sequência dos procedimentos após dissecação dos folículos ovariano. Fotomacrografias dos folículos ovarianos, em (A) folículos sob esteromicroscópio; em (B) utilização do paquímetro para determinação do diâmetro folicular e em (C) rompimento do folículo ovariano bovino com utilização de agulhas 18G. Fotomicrografia do oócito bovino nota-se em (D) parte do folículo ovariano rompido.

4.3. Maturação *in vitro* (MIV)

Os oócitos foram individualmente maturados em gotas de 09 μl de meio de maturação, constituído por TCM-199 tamponado com Bicarbonato e suplementado com 10% SFB, 0,2 mM de piruvato de sódio, 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de hormônio folículo estimulante - FSH (Folltropin-V; Bioniche Animal Health Belleville, Canada), 5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de gentamicina e 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de hormônio luteinizante- LH; sob óleo mineral, em incubadora a 38,5° C e atmosfera úmida de 5% CO_2 em ar atmosférico.

Após 19 horas de MIV, os oócitos foram desnudados individualmente em gotas de solução pré-aquecida - 20 minutos em estufa - de hialuronidase a 0,2% em tampão fosfato salino (PBS) livre de Ca^{++} e Mg^{++} com auxílio de uma pipeta de Pasteur esticada manualmente sob lamparina. Os oócitos, sem células do *cumulus*, foram lavados em meio de maturação e colocados novamente em estufa em meio MIV até completarem 26 horas de maturação.

Quando desnudos, os oócitos foram classificados em maturados ou não-maturados, baseado na presença ou ausência, respectivamente, do primeiro corpúsculo polar (1° CP), que determina a chegada do oócito ao estágio de Metáfase II.

Figura 7. Fotomicrografias de oócitos bovinos. Observa-se em (A) um oócito imaturo, em (B) oócito desnudo e em (C) oócito maduro. A seta aponta o primeiro corpúsculo polar

4.4. Ativação Partenogenética

Todos os oócitos foram ativados, independente de terem sido classificados como maturados ou não-maturados e lavados, individualmente, em três gotas de meio H199 (TCM-199 com 25mM Hepes) suplementado com 0,5 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 2 μ l/mL de piruvato e 5 μ l/mL de gentamicina. Depois de lavados, a ativação foi feita com o meio citado acima com adição de 5 μ M de ionomicina, por 5 minutos.

Após o período sob a ação da ionomicina, os oócitos foram lavados, individualmente, três vezes, em meio H199 saturado (TCM-199 com 25mM Hepes com 30mg/mL de BSA, 2 μ l/mL de piruvato e 5 μ l/mL de gentamicina), para remoção completa da ionomicina e posteriormente lavados, novamente três vezes, em meio de cultivo em fluido de oviduto sintético (SOF) suplementado com 5 mg/mL de BSA, 2,5% SFB, 0,2 mM de piruvato, 10 mg/mL de gentamicina e 2 mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), e então colocados em uma placa de *Petri* (35 mm) com

meio SOF com 6-DMAP, descrito acima, em gotas individuais de 9µl, em estufa a 38,5°C, 5%CO₂ em ar atmosférico, por 3 horas.

4.5. Cultivo embrionário *in vitro*

Depois da ativação, os oócitos foram lavados, três vezes, em meio SOF suplementado com 5 mg/mL de BSA, 2,5% SFB, 0,2 mM de piruvato, 10 mg/mL de gentamicina e foram co-cultivados na presença de monocamada de células da granulosa, na mesma placa da maturação com meio renovado, em gotas de 9µl (1 oócito/gota) do meio SOF, cobertas por óleo mineral, em estufa com a temperatura de 38,5°C em atmosfera úmida de 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂, por 8 dias.

Os embriões foram avaliados no D2 pós-ativação quanto à clivagem e nos D7 e D8 pós-ativação quanto à capacidade de chegar ao estágio de blastocisto ou não.

4.6. Preparação das amostras para a análise dos lipídios

As amostras de líquido folicular e células do folículo foram separadas em três grupos de acordo com a capacidade de desenvolvimento dos oócitos. Se o oócito não tivesse capacidade para clivar, seu respectivo líquido folicular e/ou células do folículo seriam destinados ao grupo dos não clivados (NCLIV), o mesmo para líquido folicular e células do folículo do ambiente folicular de oócitos que clivaram mas não chegaram ao estágio de blastocisto (CLIV) e para líquido folicular e células do folículo do microambiente folicular de oócitos que conseguiram se desenvolver até o estágio de blastocisto (BLAST).

Foram feitos três experimentos, sendo dois utilizando equipamentos de espectrometria equipados com Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) e um com Cromatografia líquida em conjunto com espectrometria de massas com aquisição de dados MS/MS independente (LC- MS/MS) chamado SWATH - AB Sciex.

Portanto, o experimento 1 refere-se a análise do perfil lipídico do líquido folicular feito pela técnica de MALDI, o experimento 2 é o estudo do perfil lipídico das células do folículo ovariano através da técnica de MALDI e, o experimento 3 é a análise do perfil lipídico do líquido folicular utilizando a técnica LC-MS/MS.

4.6.1. Experimento 1

A extração dos lipídios do líquido folicular foi realizada com 10µL de amostra, 100µL de Metanol e 100µL de Clorofórmio, posteriormente colocada no vórtex por 1 minuto, centrifugada a 16000g por 15 minutos e foi retirado 100µL do sobrenadante e seco em temperatura ambiente. Para este experimento a placa de MALDI foi preparada com 1µl de amostra, deixado em temperatura ambiente para secar, adicionou novamente 1µl de amostra em cada *spot* depois que secaram novamente foi adicionado 1 uL de matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid (Matrix DHB).

4.6.2. Experimento 2

Células provenientes do ambiente folicular foram utilizadas para a extração dos lipídios de acordo com o protocolo de Bligh and Dyer (Bligh et al. 1959), mas antes da extração 50µL de água ultrapura foi adicionado às células e a mistura foi colocada 1 minuto em vórtex, para promover a lise celular. Após a extração as amostras foram ressuspensas em solução 90% (v:v) MEOH:Cloroformio. A placa de MALDI foi preparada com 1µl de amostra, deixado em temperatura ambiente para secar, adicionou novamente 1µl de amostra em cada *spot* depois que secaram novamente foi adicionado 1 uL de matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid, para análise.

4.6.3. Experimento 3

Lipídios foram extraídos do líquido folicular utilizando a solução: 10µL de amostra, 100µL de Metanol e 100µL de Clorofórmio. Posteriormente colocada no vórtex por 1 minuto, centrifugada a 16000g por 15 minutos. O sobrenadante, aproximadamente 100µL, foi retirado e deixado em temperatura ambiente até que o solvente evaporasse. Após a extração dos lipídios foi adicionado acetato de amônio nas amostras para a análise no modo positivo e ácido acético para a análise do modo negativo.

4.7. Obtenção do perfil lipídico

Os experimentos para a obtenção do perfil lipídico foram realizados em diferentes laboratórios. Portanto, os equipamentos e as formas de obtenção dos dados foram distintas. As metodologias usadas serão descritas nos parágrafos a seguir.

4.7.1. Experimento 1

Esta primeira análise do perfil lipídico do líquido folicular foi feita em parceria com o Dr. Edson Guimarães Lo Turco na Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP. Foram utilizadas 30 amostras, sendo 10 de cada grupo experimental - não clivados, clivados e blastocistos.

Os espectros de massa das células do folículo foram adquiridos utilizando um equipamento MALDI AltoFlex da marca Bruker. Foi utilizado um Laser de 1000 Hertz com uma potência de 50% foram realizados cinco seções de 500 tiros cada em modo manual durante 15 segundos. Os cromatogramas e espectros de massas gerados foram adquiridos pelo programa MassLynx 4.1 (Waters – Manchester, UK). Os dados serão processados através do software MarkerLynx XS Application Manager (Waters – Manchester, UK), no qual serão feitos os ajustes dos dados.

4.7.2. Experimento 2

Este experimento, do perfil lipídico das células do ambiente folicular, foi realizado em parceria com o laboratório do Prof. Dr. Carlos Alberto Labate na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP. Foram utilizadas 7 amostras por grupo experimental (não clivados, clivados e blastocistos).

Os espectros de massa das células do folículo foram adquiridos utilizando um equipamento MALDI da ABSciex, no modo de análise reflector positivo. A voltagem da fonte de ionização de 3400 kvolts no modo MS, sendo aplicado 1000 *shots/spectrum* no modo MS. A análise foi realizada no modo automático e a calibração realizada com padrão interno, CAL Mix1 (ABSciex). A faixa de aquisição foi de 700-1200 *m/z*. O programa utilizado para obter os resultados da espectrometria foi: o ABSciex Maldi ToF/ToF series explorer version 4.1.0) e o programa utilizado para fazer as análises dos conjuntos de dados foi o MarkerView.

4.7.3. Experimento 3

Neste ultimo estudo dos lipídios do líquido folicular por LC-MS e MS/MS, foi desenvolvido em parceria com o Dr. Edson Guimarães Lo Turco na Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP. Foram analisadas, no total, 30 amostras, 10 do grupo não clivados, 10 do grupo clivados e 10 do grupo dos blastocistos.

O equipamento utilizado neste estudo foi AB Siex no modo reflector positivo e negativo, através da técnica de cromatografia líquida (LC) em conjunto com espectrometria de massas com aquisição de dados MS/MS independente chamado SWATH - AB Sciex. A faixa de detecção de íons foi de 200-1200 m/z.

4.8. Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas de forma comparativas entre 3 grupos experimentais: Não clivados (NCLIV), Clivados (CLIV) e Blastocistos (BLAST), utilizando os lipídios (m/z) e suas respectivas intensidades detectados pelo equipamento.

Foi utilizado o *website* MetaboAnalyst para as análises dos conjuntos de dados. Primeiramente foram feitas dois métodos de análise multifatorial: a análise do componente principal (PCA) e a análise discriminatória parcial dos quadrados mínimos (PLS-DA), de acordo com os resultados obtidos por essas duas primeiras análises, foram feitos testes de análise de variância (ANOVA) e posteriormente, quando necessário, o teste t ou teste de Fisher. A importância da variável na projeção (VIP) foi utilizada para identificar os íons que tiveram maior efeito discriminatório entre os grupos em cada comparação.

Após a estatística, os íons provenientes do experimento 1 e 2 foram identificados no banco de dados online, através do m/z detectado pelo equipamento. O banco de dados utilizados foi o METLIN: Metabolite and Tandem MS Database (<http://metlin.scripps.edu/index.php>).

5. RESULTADOS

5.1. Produção *in vitro* de blastocistos

O desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto foi necessário para conhecer o potencial de desenvolvimento dos oócitos e separar os grupos deste estudo. A produção de embriões partenotos foi feita mediante ativação partenogenética em sistema individual que teve início desde a maturação até o cultivo. No total foram realizadas 11 (onze) rotinas de produção de embriões. Do total de oócitos coletados, 29,31% desenvolveram até o estágio de blastocisto. Visando garantir que o desenvolvimento atingido tenha forte relação com o potencial do oócito e não com a metodologia do cultivo individual, rotinas com taxa de produção de blastocistos (% clivados) inferior a 35%, não foram utilizados no experimento. O número de oócitos por rotina e as taxas de produção são demonstradas a seguir na tabela 1. Durante as rotinas o desenvolvimento embrionário foi avaliado duas vezes, a primeira vez quanto a clivagem (positiva ou negativa) no terceiro dia após a ativação partenogenética e a segunda vez quanto à capacidade de desenvolver até o estágio de blastocisto (blastocisto ou não) no sétimo e/ou oitavo dia após a ativação (figura 4). A partir das amostras coletadas foram feitos os três experimentos que constam nesta dissertação.

Tabela 1. Produção individual de embriões partenotos, em sistema de co-cultivo com células do cumulus; clivagem (48 h – D2) e blastocistos (D7 e D8).

Rotina	Nº de oócitos	Nº de Clivados	Clivados (%)	Nº de Blastocistos	Blastocistos (% oócitos)	Blastocistos (% clivados)
1	16	10	62	6	37	60
2	16	9	56	5	31	55
4	19	11	57	5	26	45
6	21	15	71	7	33	46
7	18	11	61	4	22	36
8	22	16	72	8	36	50
9	23	17	74	7	30	41
10	17	11	64	5	29	45
11	22	11	50	4	18	36
TOTAL	174	111	63,79	51	29,31	45,94

Figura 8. Fotomicrografias de embriões bovinos. Na foto (A) um embrião de duas células, em D2, dia da contagem dos clivados, e na foto (B) um embrião em D7, dia da contagem dos blastocistos.

5.2. Análise do perfil lipídico

As amostras coletadas de líquido folicular e de células do folículo foram analisadas por duas diferentes técnicas de espectrometria de massas, devido à disponibilidade do equipamento e afinidade de detecção. Foram utilizados neste projeto 2 tipos de espectrometria de massas: o MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization) e o LC-MS/MS (Cromatografia líquida em conjunto com espectrometria de massas com sistema de aquisição de dados MS/MS independente chamado SWATH - AB Sciex).

5.2.1. Experimento 1: Perfil lipídico do líquido folicular - MALDI

Para compreender o perfil lipídico do líquido folicular foram utilizadas 10 amostras de cada grupo, através da técnica de MALDI. Foram identificados, no total, 227 íons (picos (mz/rt)). A normalização dos dados foi realizada por intensidade relativa. As diferenças entre os grupos foram pontuais o que poderá ser notado nas diferentes técnicas de análises estatísticas utilizadas (figura 5).

Figura 5. Heatmaps mostrando no geral a distribuição dos lipídios dentro dos grupos experimentais, nas colunas diferentes lipídios (m/z) detectados pelo equipamento, nas linhas as amostras e as cores representam as intensidades. Dados foram agrupados de acordo com os grupos experimentais sendo o vermelho o grupo dos Blastocistos, o verde o grupo dos Clivados e em azul o grupo dos Não-clivados. Em (A) heatmap do MALDI do líquido folicular e em (B) o heatmap do MALDI das células do cumulus (exp. 2).

Para o estudo dos dados obtidos e as comparações entre os três grupos experimentais foram utilizados dois métodos de análises multivariadas, o PCA e o PLS-DA, posteriormente foi feita a ANOVA e para testar a hipótese de diferença entre os grupos, quando necessário, foi utilizado o teste t. Como pode ser observado na figura 6 não houve uma separação satisfatória dos grupos, nem no PCA nem no PLS-DA.

Figura 6. Representação gráfica 3D entre os componentes principais 1, 2 e 3. Em (A) PCA e em (B) PLS-DA. Os triângulos representam as amostras, em vermelho o grupo dos blastocistos, em verde os clivados e em azul os não-clivados.

Mesmo com a não separação dos grupos no PLS-DA os íons utilizados nessa análise, denominados *Vip socores* (figura 7) foram analisados. Um gráfico com esses lipídios (m/z) importantes e suas respectivas intensidades médias e desvio padrões está representado na figura 8.

Figura 7. Íons identificados pelo PLS-DA como importantes para a separação dos grupos. As caixas coloridas a direita relacionam as concentrações dos metabólitos selecionados em cada grupo experimental. Da esquerda para a direita blastocistos, clivados e não-clivados.

Figura 8. Gráfico dos íons identificados como importantes pelo PLS-DA e suas respectivas intensidades de detecção e desvios padrões.

Após a identificação dos lipídios importantes para o PSL-DA foi feito um teste t para constatar se haviam diferenças entre os grupos em algum desses lipídios. A tabela a seguir (tabela 2) apresenta os dois lipídios que foram estatisticamente diferentes entre os grupos experimentais, os valores de p encontrados e os grupos em que foram predominantes.

Tabela 2. Lipídios do *vip score* do PLS-DA, do MALDI do líquido folicular, que apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais.

Lipídios (<i>m/z</i>)	Valor de p	Grupos predominantes
783,17	0,03	NCLIV e CLIV
761,19	0,04	CLIV e BLAST

Na ANOVA foram identificados 8 picos (*mz/rt*) estatisticamente diferentes entre os grupos estudados (tabela 3). Para conhecer a relevância dos íons foram criados gráficos das intensidades médias dos íons nos diferentes grupos (figura 9), nos quais é possível notar que os lipídios possuem frequências muito baixas, provavelmente fazem parte da linha de base dos espectros e que os desvios são muito altos.

Tabela 3. Íons identificados com significância estatística pela análise de variância e posteriormente pelo teste t, no MALDI do líquido folicular bovino.

Lipídios	Valor de p	Grupos predominantes
921,63	0,02	NCLIV e CLIV
923,99	0,04	NCLIV e CLIV
1037,61	0,05	CLIV
1113,92	0,01	CLIV e BLAST
1135,31	0,01	CLIV
1151,64	0,01	CLIV e BLAST
1161,73	0,01	CLIV e BLAST
1182,37	0,03	CLIV e BLAST

Figura 9. Gráfico dos lipídios identificados na ANOVA. No eixo X os lipídios e no eixo Y a intensidade de detecção.

Os íons foram procurados no banco de dados METLIN com um erro de até 50ppm para a identificação dos lipídios correspondentes. Os íons 921,63 m/z ; 923,99 m/z ; 1037,61; 1113,92 m/z ; 1151,64 m/z ; 1161,73 m/z e 1182,37 m/z , nas condições de busca citadas, não foram identificados, apenas o íon 1135,31 m/z foi identificado, como ardeparin, o qual não é característico do tipo de análise (Matriz DHB + MALDI) e nem comumente encontrados em amostras como líquido folicular ou embriões.

A correta e confiável identificação destes lipídios exige a fragmentação dos dados (MS/MS) ou correlação com estudos prévios que tenham feito fragmentação e a identificação desses íons. Na literatura, apenas 2 dos íons detectados pelo teste ANOVA já foram anteriormente fragmentados e identificados por MALDI, o 921,63 m/z e o 923,99 m/z (tabela 4).

Tabela 4. Identificação dos lipídios significativos no teste ANOVA do MALDI do líquido folicular, baseada em experimentos prévios com fragmentação na técnica MALDI.

m/z detectados	m/z descrito	Lipídio	Referência
921,63	921,7	OOL ou LLS (54:4) + K	Hayasaka et al., 2009
	921,74	TAG (16:0/20:3/18:1) + K	Ferreira et al., 2010
923,99	923,7	OOO ou SOL (54:3) + K	Ferreira et al., 2010

O – ácido oleico; L – ácido linoleico; S – ácido esteárico; TAG – triacilglicerídeo

Foram feitos testes t comparando os grupos dois a dois, avaliando o potencial de chegar ao estágio de blastocisto (BLASTxNBLAST) e o potencial de clivagem (CLIVxNCLIV).

Nas comparações entre BLASTxNBLAST 6 íons foram diferentes, mas apresentaram as mesmas características de quando comparados os três grupos, altos pesos moleculares (m/z) baixa frequências nos espectros, no máximo 2,5%, e nos testes PCA e PSL-DA não houve separação dos grupos.

Quando comparados CLIVxNCLIV, 5 íons foram diferentes no teste t, apenas um teve boa intensidade e foi identificado em estudos prévios de MALDI com fragmentação, o 836,20 m/z (valor de p 0,04) que foi detectado por Fuchs et al. (2008) com o peso molecular de 836,6 m/z e identificado como PC 18:2/22:5 + H^+ (Figura 10). Na comparação CLIVxNCLIV também não houve separação dos grupos no PCA e no PSL-DA.

Figura 10. Lipídio estatisticamente diferente entre os grupos Clivados e Não Clivados que pôde ser identificado baseado na literatura como PC 18:2/22:5 + H⁺.

Por fim, foi feita análise dos dados retirando *outliers* detectados, mas o resultado foi semelhante aos apresentados anteriormente. Uma alternativa, que será feita futuramente é considerar apenas lipídios já caracterizados por MALDI e refazer a estatística.

5.2.2. Experimento 2: Perfil lipídico das células do folículo - MALDI

Nas análises por MALDI das células do ambiente folicular bovino foram utilizadas 07 amostras por grupo, 516 íons (m/z) foram detectados. Como já ilustrado anteriormente através do heatmap e a seguir nos espectros (figura 11), os grupos experimentais não apresentaram diferenças muito evidentes, ou seja, o perfil lipídico dentro dos grupos experimentais é semelhante.

Figura 12. Gráficos de barras dos íons estatisticamente diferentes no teste ANOVA, com $p < 0,05$ de significância. Nos eixos x os grupos NCLIV, CLIV e BLAST, nesta ordem e no eixo Y a intensidade relativa (%). A barra de erros representa o desvio padrão dos grupos experimentais.

Tabela 5. Identificação dos íons detectados pelo teste ANOVA, nos dados do MALDI das células do folículo, com intensidade maior que 5%, em dados anteriores de MS/MS.

m/z dados	Grupo (valor de p)	m/z descrita	Fonte dos dados	Lipídios
909.5542	CLIV (0.01)	909.6	Saraiva et al., 2009	OOS, SSL (54:2) + Na ⁺
925.5828	CLIV (0.04)	925.7	Schiller et al., 2003	1-Palmityl-2-docosaheptaenoyl-PC (Na ⁺)
			Ferreira et al., 2010	OOS or SSL (54:2)+ K
923.6035	CLIV (0.02)	923.7	Ferreira et al., 2010	OOO or SOL (54:3)+ K

Nas análises multivariadas, o PCA e PSL-DA não houve separação dos grupos (figura 13). Mesmo assim, os íons utilizados nessa análise, denominados *Vip scores* (figura 14) foram analisados.

Figura 13. Representação 3D do PLS-DA das células do folículo, entre os componentes principais 1, 2 e 3. Os triângulos representam as amostras, em vermelho os blastocistos, em verde os clivados e em azul os não clivados.

Figura 14. Íons identificados pelo PLS-DA como importantes. As caixas coloridas a direita relacionam as concentrações dos metabólitos selecionados em cada grupo experimental. Da esquerda para a direita blastocistos, clivados e não-clivados.

Dentre os lipídios identificados como importantes para o PLS-DA apenas um lipídio foi significativo biologicamente, o 1071,5984 m/z o qual não é característico desse tipo de análise e não pode ser identificado em banco de dados nem em trabalhos anteriores com fragmentação nas mesmas condições. O íon 1071,5983 foi significativamente mais intenso no grupo CLIV e BLAST.

5.2.3. Experimento 3: Perfil lipídico do líquido folicular - LC-MS e MS/MS

As amostras de líquido folicular bovino foram submetidas à LC-MS posteriormente MS/MS, ambas no modo positivo e negativo. Foram utilizadas dez amostras de cada grupo. No geral, foram identificados 978 lipídios diferentes nos dois modos de detecção.

Apenas os lipídios detectados em 70% ou mais das amostras de pelo menos um dos grupos foi incluído, portanto, foram incluídos 177 lipídios, sendo 163 detectados no modo positivo e 14 no modo negativo. O diagrama de Venn (figura 15) mostra, em qual grupo, ou grupos, esses lipídios que serão estudados foram detectados e o quadro (figura 16) identifica e localiza os lipídios contados no diagrama.

O perfil lipídico do líquido folicular bovino obtido neste experimento mostrou ser composto por diversas classes lipídicas, com participação expressiva no modo positivo de triacilglicerídeos (TAG), fosfatidilcolinas (PC), esfingomielinas (SM), monoacildiacilglicerol (MADAG), N-Acilfosfatidiletanolaminas (NAPE) entre outros e no modo negativo a classe lipídica que prevaleceu foi a dos cardiolipinas (CL).

Figura 15. Diagrama de Venn dos lipídios nos grupos experimentais. Sendo 15 nos NCLIV, 7 nos CLIV e 8 nos BLAST, 8 comuns entre NCLIV e CLIV, 5 entre CLIV e BLAST e 9 entre NCLIV e BLAST, e 125 comuns a todos os grupos estudados. Foram considerados lipídios presentes no grupo quando detectados em mais de 70% das amostras deste grupo.

Lipídios presentes em somente um dos grupos

Não Clivados	Clivados	Blastocistos
CL 68:8 (FA 18:1)	GM2 36:2;3 (LCB 18:0;2-H2O)	PIP3 34:2 (FA 18:2)
CL 82:4 (FA 16:0)	GT2 26:4;3 (LCB 18:0;2-H2O)	SM 38:4;3 (SM)
GlcE 10:3 (-GlcE)	NAPE 50:4+NH4 (-FA 17:3 (NH4))	SM 30:3;4 (SM)
Hex2Cer 36:1;3+Na	PC 32:3 (LPC)	MADAG 38:3+NH4 (-FA 13:2 (NH4))
(LCB 18:1;2-H2O,LCB 18:0;3-2H2O)	SM 38:2;4 (SM)	NAPE 56:3+NH4 (-FA 17:0 (NH4))
LPC 30:0+Na (PC)	SM 40:4;3 (SM)	PE 36:5+Li (-PE)
LPC 30:1 (PC)	TAG 54:6+NH4 (-FA 15:3 (NH4))	NAPE 58:6+NH4 (-FA 17:0 (NH4))
MADAG 54:9+NH4 (-FA 18:1 (NH4))		NAPE 58:6+NH4 (-FA 19:0 (NH4))
PC 36:0 (LPC)		
SM 32:2;3 (SM)		
SM 44:4;2 (SM)		
TAG 38:2+NH4 (-FA 18:2 (NH4))		
TAG 40:3+NH4 (-FA 16:2 (NH4))		
TAG 54:5+NH4 (-FA 15:2 (NH4))		
TAG 58:5+NH4 (-FA 17:2 (NH4))		
TAG 58:5+NH4 (-FA 17:3 (NH4))		

Lipídios presentes em dois grupos

Não clivados e clivados	Clivados e Blastocistos	Não Clivados e Blastocistos
DGDG 34:6+NH4 (-FA 17:3 (NH4))	CL 86:7 (FA 18:0)	CL 76:14 (FA 18:1)
PC 32:5+Na (LPC)	NAPE 50:3+NH4 (-FA 17:3 (NH4))	CL 82:1 (FA 16:0)
PC 34:5+Na (LPC)	NAPE 56:6+NH4 (-FA 17:0 (NH4))	LPC 12:4 (PC 104)
PC 36:1+AcO (FA 18:1)	PC 32:2 (LPC)	MADAG 50:8+NH4 (-FA 24:0 (NH4))
PC 38:2 (LPC)	SM 40:3;2 (SM)	PC 36:6+Na (PC)
SM 38:1;4 (SM)		SM 36:1;3 (SM)
TAG 42:4+NH4 (-FA 18:3 (NH4))		TAG 38:2+NH4 (-FA 14:2 (NH4))
TAG 66:3+NH4 (-FA 17:1 (NH4))		TAG 40:4+NH4 (-FA 16:3 (NH4))
		TAG 54:5+NH4 (-FA 13:2 (NH4))

Lipídios presentes nos três grupos

CE 14:0+NH4 (Chol)	PC 32:0 (PC)	PC 38:3+Na (PC)
CE 16:0+NH4 (Chol)	PC 32:0 (PC)	PE 36:0 (-PE)
CE 16:1+NH4 (Chol)	PC 32:1 (LPC)	PE 36:1 (-PE)
CE 18:2+NH4 (Chol,-FA 18:2 (NH4))	PC 32:1 (PC)	PE 36:2+Li (-PE)
CE 18:3+NH4 (Chol,-FA 18:3 (NH4))	PC 32:2 (PC)	PS 28:0 (-PS)
CE 20:3+NH4 (-FA 20:3 (NH4),Chol)	PC 32:3 (PC)	PS 36:2 (-PS)
CE 20:4+NH4 (-FA 20:4 (NH4),Chol)	PC 32:5 (PC 104)	SM 28:1;2 (LCB 18:1;2-H2O,LCB 18:0;3-2H2O)
CE 20:5+NH4 (Chol,-FA 20:5 (NH4))	PC 32:5+Na (PC)	SM 32:3;4 (SM)
CL 64:6 (FA 16:0)	PC 34:0 (LPC)	SM 32:4;4 (SM)
CL 68:6 (FA 18:0)	PC 34:0 (PC)	SM 34:2;3 (SM)
CL 76:13 (FA 18:1)	PC 34:1 (LPC)	SM 34:3;4 (SM)
CL 82:2 (FA 16:0)	PC 34:1 (PC 104)	SM 36:0;4 (SM)
CL 82:3 (FA 16:0)	PC 34:1 (PC)	SM 36:1;4 (SM)
CL 86:7 (FA 16:0)	PC 34:2 (LPC)	SM 36:2;4 (SM)
CL 86:7 (FA 18:1)	PC 34:2 (PC)	SM 36:3;4 (SM)
CerP 40:2;3-H2O (LCB 18:0;2-H2O)	PC 34:3 (PC)	SM 38:1;3 (SM)
DAG 38:1+NH4 (Chol,-FA 18:1 (NH4))	PC 34:4 (PC)	SM 38:2;3 (SM)
GT3 42:2;3 (LCB 18:1;2-H2O,LCB 18:0;3-2H2O)	PC 34:4+Na (PC)	SM 38:3;4 (SM)
LPC 18:3 (PC 104)	PC 34:5 (PC)	SM 38:4;4 (SM)
LPS 26:0 (-PS)	PC 34:5+Na (PC)	SM 40:2;3 (SM)
	PC 34:6+Na (PC)	SM 40:3;3 (SM)
	PC 36:0 (PC)	

M(IP)2C 30:2;2 (LCB 18:1;2-H ₂ O,LCB 18:0;3-2H ₂ O)	PC 36:0+Na (LPC)	SM 40:3;4 (SM)
MADAG 40:3+NH ₄ (-FA 15:2 (NH ₄))	PC 36:0+Na (PC)	SM 40:4;4 (SM)
MADAG 40:4+NH ₄ (-FA 15:3 (NH ₄))	PC 36:1 (LPC)	SM 42:3;2 (SM)
MADAG 40:4+NH ₄ (-FA 17:3 (NH ₄))	PC 36:1 (PC)	SM 42:4;2 (SM)
MADAG 42:3+NH ₄ (-FA 17:2 (NH ₄))	PC 36:1+Na (LPC)	TAG 42:3+NH ₄ (-FA 17:3 (NH ₄))
MADAG 42:3+NH ₄ (-FA 17:3 (NH ₄))	PC 36:1+Na (PC)	TAG 42:3+NH ₄ (-FA 18:2 (NH ₄))
MADAG 46:4+NH ₄ (-FA 17:3 (NH ₄))	PC 36:2 (LPC)	TAG 46:0+NH ₄ (-FA 17:0 (NH ₄))
MADAG 48:4+NH ₄ (-FA 17:3 (NH ₄))	PC 36:2 (PC)	TAG 46:3+NH ₄ (-FA 17:3 (NH ₄))
MADAG 50:4+NH ₄ (-FA 17:3 (NH ₄))	PC 36:2+Na (LPC)	TAG 48:6+NH ₄ (-FA 17:3 (NH ₄))
NAPE 40:1+NH ₄ (-NAPE (16:0 NH ₄))	PC 36:2+Na (PC)	TAG 54:3+NH ₄ (-FA 17:3 (NH ₄))
NAPE 56:1+NH ₄ (-FA 24:0 (NH ₄))	PC 36:3 (LPC)	TAG 54:3+NH ₄ (-FA 18:1 (NH ₄))
NAPE 56:4+NH ₄ (-FA 17:0 (NH ₄))	PC 36:3 (PC)	TAG 56:5+NH ₄ (-FA 15:2 (NH ₄))
NAPE 58:4+NH ₄ (-FA 19:0 (NH ₄))	PC 36:3+Na (PC)	TAG 56:6+NH ₄ (-FA 15:3 (NH ₄))
NAPE 58:9+NH ₄ (-FA 17:2 (NH ₄))	PC 36:4 (LPC)	TAG 56:6+NH ₄ (-FA 17:3 (NH ₄))
NAPE 58:9+NH ₄ (-FA 17:3 (NH ₄))	PC 36:4 (PC)	TAG 58:10+NH ₄ (-FA 17:3 (NH ₄))
PC 30:0 (PC)	PC 36:5 (PC)	TAG 58:6+NH ₄ (-FA 17:3 (NH ₄))
PC 30:1 (PC)	PC 36:5+Na (PC)	TAG 58:7+NH ₄ (-FA 17:3 (NH ₄))
PC 30:2 (PC)	PC 36:6 (PC)	TAG 60:7+NH ₄ (-FA 17:3 (NH ₄))
PC 30:5+Na (PC)	PC 38:1 (PC)	TAG 60:8+NH ₄ (-FA 17:3 (NH ₄))
PC 32:0 (LPC)	PC 38:1+Na (PC)	TAG 66:3+NH ₄ (-FA 17:2 (NH ₄))
	PC 38:2 (PC)	TAG 66:4+NH ₄ (-FA 17:3 (NH ₄))
	PC 38:2+Na (PC)	

Figura 16. Quadro para identificação dos lipídios representados numericamente no diagrama de Venn.

Os espectros representativos dos líquidos foliculares referentes aos três grupos experimentais, não-clivados, clivados e blastocistos estão ilustrados a seguir, nos modos positivo (figura 17) e negativo (figura 18). Algumas discretas diferenças entre os grupos podem ser observada. Nota-se também a maior quantidade de lipídios detectados no modo positivo em comparação com o modo negativo.

Figura 17. Espectros de LC-MS do líquido folicular bovino no modo de detecção positivo. (A) Não-clivados, (B) clivados (C) blastocistos.

Figura 18. Espectros de LC-MS de líquido folicular bovino em modo negativo. (A) amostra do grupo Não-clivados, (B) amostra do grupo Clivados (C) amostra do grupo Blastocistos.

No modo negativo (MS/MS), para entender e detectar as diferenças nos perfis lipídios do líquido folicular, análises estatísticas multivariadas, como PCA e PLS-DA seguidas por ANOVA e testes t foram feitas. A separação dos grupos experimentais não foi satisfatória na análise do PCA, no PLS-DA os grupos foram discretamente separados (figura 19). Os 10 íons importantes para o PLS-DA, estão identificados na figura 20 e na tabela 6 com suas respectivas massa/carga e a intensidade média de detecção dentro dos grupos.

Figura 19. Representação do PLS-DA modo negativo. Os triângulos representam as amostras, sendo os vermelhos do grupo BLAST, os verdes do CLIV e os azuis do NCLIV. **A** no modo positivo e **B** no modo negativo.

Figura 20. Íons identificados pelo PLS-DA como importantes. As caixas coloridas à direita indicam as concentrações dos lipídios em cada grupo experimental. Da esquerda para a direita blastocistos, clivados e não-clivados.

Tabela 6. Os 15 lipídios mais importantes de acordo com o PSL-DA, modo negativo LC-MS/MS.

Lipídios	<i>m/z</i>	Grupos	Valor de p
CL 64:6 (FA 16:0)	669.4 (255.2)	CLIV e BLAST	0,04
PC 36:1+AcO (FA 18:1)	846.6 (281.2)	NCLIV e CLIV	0,02
PC 36:1+AcO (FA 18:0)	846.6 (283.3)	NCLIV e CLIV	0,04
CL 76:13 (FA 18:1)	746.7 (281.2)	NCLIV e CLIV	0,04
CL 68:6 (FA 18:0)	697.5 (283.3)	CLIV e BLAST	0,02
PIP3 34:2 (FA 18:2)	535.9 (279.2)	Todos	-
CL 84:15 (FA 18:2)	800.7 (279.2)	NCLIV e CLIV	0,04
PIP3 34:2 (FA 16:0)	535.9 (255.2)	Todos	-
CL 86:7 (FA 18:0)	822.8 (283.3)	Todos	-
CL 82:4 (FA 16:0)	797.7 (255.2)	NCLIV e BLAST	0,04
CL 86:7 (FA 16:0)	822.8 (255.2)	Todos	-
NAPE 42:0+AcO (FA 18:0)	904.8 (283.3)	Todos	-
PC 34:2+AcO (FA 18:2)	816.6 (279.2)	Todos	-
PC 34:2+AcO (FA 16:0)	816.6 (255.2)	Todos	-
CL 86:8 (FA 16:0)	821.8 (255.2)	Todos	-

A maneira como os lipídios variam dentro dos grupos, o valor do desvio padrão e sua intensidade de detecção são importantes para avaliar a relevância biológica destes íons identificados pelos testes estatísticos. Esses dados representados nos gráficos de barras a seguir (figura 21) dos íons importantes no PLS-DA.

Figura 21. Representação gráfica dos 15 íons mais importantes para o PLS-DA do líquido folicular no modo negativo. No eixo X dos gráficos estão os grupos e no eixo Y a intensidade relativa. Barras representam erro padrão das amostras dentro dos grupos.

No modo de detecção positivo (LC-MS/MS), utilizando técnica de componentes principais, os grupos foram discretamente separados, mas a variação dos dados

explicada pelo PLS-DA foi baixa (figura 22), os íons importantes para o PLS-DA estão ilustrados na figura 23.

Figura 22. Gráfico 3D da análise PLS-DA dos dados em modo positivo do LC-MS/MS. Representados em vermelho o grupo dos blastocistos, em verde o grupo dos clivados e em azul o grupo dos Não-clivados.

Figura 23. Íons identificados pelo PLS-DA como importantes. As caixas coloridas à direita indicam as concentrações dos lipídios em cada grupo experimental. Da esquerda para a direita blastocistos, clivados e não-clivados.

Os 15 lipídios importantes (*vip scores*) foram analisados quanto à variação entre os grupos, intensidade e desvio padrão e os gráficos dos quatro lipídios mais consistentes estão representados nos gráficos a seguir (figura 24). Mas não houve diferença significativa entre eles pelo teste t.

Figura 24. Lipídios com variação mais consistente entre os *vip scores* do PLS-DA do modo positivo, barras representam o erro padrão dos grupos.

Na análise de variância 16 íons apresentaram diferença significativa, somente 3 apresentaram variação consistente entre os grupos: CE 14:0+NH4 (Chol), PC 32:3 (LPC) e SM 40:3,4 (SM) com pesos moleculares de 614,6-369,4 m/z ; 728,6-125,0 m/z e 815,8-184,1 m/z respectivamente (figura 25). O CE e o PC em maior concentração no grupo NCLIV e o SM no grupo CLIV.

Figura 25. Gráfico dos lipídios diferentes entre os grupos no teste ANOVA, com $p < 0,05$. Barras ilustram erro padrão positivo e negativo.

Como as intensidades no geral foram baixas e os desvios padrões muito amplos, uma alternativa para esses dados foi selecionar os lipídios mais expressos e refazer as análises estatísticas para melhorar a busca de marcadores de qualidade oocitária. Para essas análises foram selecionados os lipídios que foram expressos em pelo menos 50% das amostras de pelo menos um grupo. Nesses dados foi realizado o teste de variância e posteriormente teste t. A figura 26 ilustra a intensidade dos íons selecionados pela ANOVA nos três grupos com seus respectivos erro padrão. Na tabela 7 estão identificados os grupos onde esses lipídios foram mais intensos, o *m/z* correspondente e o valor de *p*.

Figura 26. Gráfico referente aos lipídios significativos no teste ANOVA. As barras representam a intensidade de detecção dentro de cada grupo e seus respectivos erros padrão.

Tabela 7. Lipídios significativos no teste ANOVA e teste t, no modo positivo do LC MS/MS, considerando íons intensos.

Lipídios	<i>m/z</i>	Grupos	Valor de <i>p</i>
CE 16:0+NH4 (Chol)	642.6 (369.4)	NCLIV	0,02
MADAG 50:8+NH4 (-FA 24:0 (NH4))	822.8 (437.2)	BLAST	0,01
SM 34:2;4 (SM)	733.6 (184.1)	BLAST	0,02
CE 20:4+NH4 (-FA 20:4 (NH4),Chol)	690.6 (369.4)	NCLIV e CLIV	0,03
GlcdE 10:3 (-GlcdE)	223.1 (149.0)	NCLIV	0,03
GT2 26:4;3 (LCB 18:1;2-H2O,LCB 18:0;3-2H2O)	904.9 (282.3)	BLAST	0,04
NAPE 58:0+NH4 (-FA 18:0 (NH4))	1087.8 (786.7)	CLIV e BLAST	0,05
PC 36:4 (PC)	782.6 (184.1)	CLIV e BLAST	0,04
PC 32:1 (PC)	732.6 (184.1)	CLIV e BLAST	0,00

Foi realizada também uma análise chamada *dada fusion*, que significa fazer uma estatística com a união dos dados dos dois modos de detecção, positivo e negativo do LC-MS/MS. No PLS-DA desta análise uma maior separação dos grupos pode ser observada (figura 27), mas os íons importantes foram semelhantes aos apresentados nas análises individuais do modo positivo (figura 28), com um único lipídio diferente, o PI 22:0, que foi identificado nos grupos clivados e dos blastocistos, com $p < 0,05$ (figura 29).

Figura 27. Gráfico 3D da análise de componentes principais PLS-DA *dada fusion* LC-MS/MS. Representados em vermelho o grupo dos blastocistos, em verde o grupo dos clivados e em azul o grupo dos Não-clivados.

Figura 28. Íons importantes pelo PLS-DA, do *dada fusion*. Os quadrados coloridos à direita indicam as concentrações dos lipídios em cada grupo experimental. Da esquerda para a direita blastocistos, clivados e não-clivados.

Figura 29. Lipídio diferente entre o PLS-DA modo positivo e *dada fusion*.

6. DISCUSSÃO

O líquido folicular é essencial para a maturação oocitária, fertilização, diferenciação e proliferação das células da granulosa (PINERO-SAGREDO et al., 2010). Para esclarecer a composição lipídica e sua possível contribuição para o desenvolvimento de capacidade oocitária este estudo descreve e compara o perfil lipídico do líquido folicular e das células do folículo que deram origem a oócitos com e sem capacidade ao desenvolvimento. As principais ferramentas utilizadas foram produção individual de embriões partenotos bovinos e lipidômica.

A partir rotinas de produção com taxas acima de 35% de blastocistos/clivados, as amostras de fluido folicular e células nele contidas colhidas previamente foram separadas em grupos: não-clivados, clivados e blastocistos e avaliadas individualmente. Os íons e lipídios foram obtidos por MALDI e por LC-MS com fragmentação MS/MS. Nas análises feitas pela técnica de MALDI, os resultados não foram os esperados por conta da afinidade da matriz DHB utilizada e pela falta de fragmentação não puderam ser conclusivos, mas indicaram uma maior concentração de ácidos oleico, linoleico, esteárico e TAG no grupo CLIV. Na técnica de LC-MS/MS o perfil lipídico do líquido folicular foi caracterizado com grande variedade de lipídios identificados, alguns lipídios foram diferentes entre os grupos, também foram identificados lipídios ainda não descritos em literatura no líquido folicular, como o glicerofosfoinositol tri-fosfato (PIP3).

Existem estudos nos quais o cultivo individual é inevitável, por exemplo, nos retrospectivos relacionados à qualidade oocitária, no desenvolvimento de técnicas não-invasivas de avaliação de oócitos, entre outros e a maioria encontra dificuldades com os protocolos de produção, pois as taxas de produção de blastocistos são insatisfatórias (OYAMADA et al., 2004, GOOVAERTS et al., 2010). Trabalhos como o de Biase et al (2009) e de Chiaratti et al. (2010) que utilizaram modelos retrospectivos relacionados à qualidade e ao potencial de desenvolvimento oocitário demonstram que esse modelo é uma importante ferramenta para avaliar o potencial do desenvolvimento embrionário.

O cultivo individual é normalmente evitado devido às baixas taxas de blastocistos, justificadas pela ausência de comunicação autócrina e parácrina com oócitos ou embriões “vizinhos” (GOPICHANDRAN; LEESE, 2006) e também devido ao maior dispêndio de tempo e trabalho (GOOVAERTS, et al., 2011). Para oferecer

condição ao oócito de expressar seu potencial de desenvolvimento este estudo usou um corte bastante criterioso, e considerou apenas rotinas de produção com taxa de blastocisto/clivados igual ou acima de 35%. Poucos trabalhos apresentaram porcentagem de blastocistos de 34 a 39% após todas as etapas de produção - maturação, fertilização e cultivo- individuais (ARAKI et al., 1998).

A primeira técnica utilizada neste estudo para avaliar o perfil lipídico das amostras foi a matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS). Essa técnica tem sido bem sucedida em estudos de composição lipídica além de outras moléculas biológicas (FUCHS; SCHILLER, 2008), e pode contribuir para o estudo da lipidômica de embriões e oócitos, em especial na detecção de lipídios das classes: SM, PC e TAG (FERREIRA et al., 2010).

No MALDI-MS do líquido folicular, dois lipídios identificados estatisticamente diferentes na ANOVA, o 921,63 m/z e o 923,99 m/z foram encontrados fragmentados em trabalhos anteriores utilizando a mesma técnica com a mesma matrix. O primeiro, 921,63 m/z , foi identificados como TAG (16:0/20:3/18:1) + K por Ferreira et al. (2010) e como OOL ou LLS (54:4) + K por Hayasaka et al. (2009) e segundo, 923,99 m/z , como OOO ou SOL (54:3) + K por Ferreira et al. (2010). Entre os íons importantes para o PLS-DA, dois íons foram significativos, 783,17 m/z e 761,19 m/z , mas sua identificação não foi possível através do METLIN com erro de até 50 ppms, nem em publicações anteriores. Nas análises comparando apenas dois grupos ClivxNCliv um lipídio foi diferente no teste de variância: 836,20 m/z , anteriormente descrito por Fuchs et al. (2008) como PC 18:2/22:5 + H⁺ e se destacou no grupo dos não clivados. Baseado nos testes de componente principal, não houve separação satisfatória dos grupos em nenhuma das análises realizadas.

Os resultados do MALDI das células do folículo não foram muito diferentes aos encontrados no fluido folicular. Poucos lipídios puderam ser identificados com base em trabalhos com a mesma técnica, mas nenhum com intensidade ou distribuição claramente destacada entre as amostras. Os lipídios 909,5542 m/z ; 925,5828 m/z e o 923,6035 m/z foram mais frequentemente identificados no grupo dos clivados, com valor de p 0,01; 0,04 e 0,02; respectivamente. Trabalhos realizados com a mesma técnica identificaram estes íons como: 909,6 m/z (909,5542 m/z) foi descrito por Saraiva et al. (2009) como OOS, SSL (54:2) + Na⁺ e por Schiller et al. (2003) como 1-Palmityl-2-docosahexaenoyl-PC (Na⁺). O 925,7 m/z (925, 5828 m/z) e o 923,7 m/z (923,6035

m/z) foram identificados por Ferreira et al. (2010) como OOS or SSL (54:2)+ K e OOO or SOL (54:3)+ K, respectivamente.

No conjunto dos dados analisados por MALDI, observa-se, portanto uma variação nos triglicerídeos principalmente aqueles contendo os ácidos graxos: oleico, linoleico, esteárico. Os TAG são geralmente detectados na faixa de 900-1000 m/z (GONZÁLES-SERRANO, et al., 2013). Os ácidos oleico, linoleico e esteárico estão entre os três lipídios mais detectados em oócitos de vacas, porcas e ovelhas (FERREIRA et al., 2011) e estão associados à qualidade oocitária (KIM et al., 2001). O ácido oleico é o ácido graxo em maior concentração no líquido folicular (TSUJII et al., 2001), é benéfico ao desenvolvimento embrionário pós-fertilização, ao estoque lipídico e à maturação oocitária (AARDEMA, et al., 2011). O ácido linoleico é o principal ácido graxo no líquido folicular bovino e tem efeito inibitório na maturação oocitária *in vitro* (MAREI et al., 2010), em altas concentrações a clivagem e o desenvolvimento até o estágio de blastocisto é reduzido (MAREI et al., 2010). O ácido esteárico é o terceiro FA mais presente no fluido folicular e pode ser convertido em ácido oleico monoinsaturado (TSUJII et al., 2001). A proporção de ácidos graxos saturados e insaturados ideal é essencial para a maturação oocitária (McKEEGAN;STURMEY, 2011). Neste estudo, estes lipídios foram predominantes no grupo dos clivados.

Os resultados das análises não foram característicos de MALDI com matriz DHB, pois essa matriz é bem seletiva para os fosfolipídios e esfingomielinas. Portanto é aconselhável a fragmentação dos dados ou refazer a estatística considerando somente os lipídios já descritos anteriormente para diminuir o "ruído" causado pelos íons de baixa intensidade e identificar melhor as diferenças entre os grupos. Nas condições em que os dados foram analisados, MALDI + matrix DHB, não houve diferença significativa biológica nos perfis lipídicos entre os grupos (não-clivados, clivados e blastocistos). Não significa que não há alteração de nenhum lipídio, pois existem diversas outras classes de lipídios, como os ácidos graxos livres (FFA), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE) e triacilgliceróis (TAG) que podem estar alterados e que podem ser detectadas por outras condições de espectrometria de massas.

Estudos tem revelado a multiplicidade de substratos energéticos usados pelos oócitos e embriões em seus primeiros estágios do desenvolvimento. E sugerido que essa

versatilidade de vias metabólicas disponíveis para a produção de energia é a chave para um maior potencial de desenvolvimento (COLLADO-FERNANDEZ et al., 2012). No perfil lipídico do líquido folicular feito pelo LC-MS/MS os lipídios identificados foram de classes diversas, com participação expressiva no modo positivo de triacilgliceróis (TAG), fosfatidilcolinas (PC), esfingomielinas (SM), monoacildiacilglicerídeos (MADAG), N-Acilfosfatidiletanolaminas (NAPE) entre outros e no modo negativo a classe lipídica que prevaleceu foi dos lipídios mitocondriais, as cardiolipinas (CL). Também foram detectados lipídios citosólicos como o CE, comumente detectados na faixa de 700-850 m/z (GONZÁLEZ-SERRANO, 2013) e alguns pouco descritos no líquido folicular como o PIP2 e PIP3, um glicerofosfolípido da classe dos glicerofosfoinositol-trifosfatos (FAHY et al., 2011).

As diferentes classes lipídicas desempenham papéis fundamentais no ambiente folicular. A comunicação intercelular dentro do folículo entre o oócito e as células do folículo que o circundam é fundamental, primeiramente pela manutenção do oócito na prófase I da meiose e posteriormente para estimulá-lo a continuação da meiose no momento da ovulação (TANGHE et al., 2002). Os glicerofosfolípidos são importantes moléculas sinalizadoras (SCHILLER et al., 1999) muito presente no ambiente folicular, em especial, nas células foliculares (células do cumulus, células da granulosa e células da teca). Aparecem em espectros com amplitude de massa-carga de 700-1000 m/z (FERREIRA et al., 2012).

Os glicerolipídios e os esfingolipídios tem papel na sinalização celular como segundos mensageiros em uma variedade de vias celulares, o primeiro é derivado dos glicerofosfolipídios e o segundo das ceramidas (GHOSH, et al., 1997). Os esfingolipídios funcionam como moléculas sinalizadoras na mediação de controle do ciclo celular, na resposta ao estresse, e na apoptose (DICKSON; LESTER, 1999, SPIEGEL, 1999). Os lipídios esteróis participam em diferentes processos biológicos como hormônios e moléculas sinalizadoras (TSAI; O'MALLEY, 1994), e são cruciais para a meiose (BYSKOV et al., 1995) e os policetídeos produzem uma grande diversidade de estruturas naturais, podendo ser modificados por vários processos, como metilação, hidrolização, oxidação entre outros (BOU KHALIL et al., 2010).

O PIP3, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato, é formado na membrana plasmática quando os receptores de fatores de crescimento ativam a fosfoinosito-3-kinase, que

fosforila o PI(4,5)P2 na posição D3 (AUGER et al., 1989). A formação do PI(3,4,5)P3 acontece em resposta a estimulação por insulina, hormônios do crescimento e fatores de crescimento epidermais. Os lipídios PIP3 e PIP2 recrutam proteínas kinases que ativam as vias de resposta dos fatores de crescimento (CANTLEY, 2002). Apenas uma pequena quantidade de PIP2 da membrana plasmática é convertida em PIP3, portanto, mesmo com vias de fatores de crescimento ativas sua concentração continua baixa (FALKENBURGUER et al., 2010).

Nas diferentes análises feitas com os dados LC-MS/MS, no modo positivo e negativo, alguns lipídios demonstraram potencial para serem marcadores biológicos de qualidade oocitária. No modo negativo, o CL 64:6 (FA 16:0) – 669,4 *m/z* e o CL 68:6 (FA 18:0) - 697,5 *m/z* foram significativos no grupo dos CLIV e BLAST e podem estar relacionados à qualidade oocitária, assim como, no modo positivo os lipídios MADAG 50:8 +NH4 (822,8 *m/z*), SM 34:2;4 (733,6 *m/z*) e GT2 26:4;3 (904,9 *m/z*) foram significativos no grupo dos blastocistos e os lipídios SM 40:3;4 (815,8 *m/z*), NAPE 58:0 + NH4 (1087,8 *m/z*), PC 36:4 (782,6 *m/z*), PC 32:1 (732,6 *m/z*) e PI 22:0 (669,4 *m/z*) foram significativos no grupos dos clivados e/ou clivados e blastocistos.

Os mecanismos envolvidos aquisição de competência do oócito ainda não foram completamente elucidados (GILCHRIST; THOMPSON, 2007). É um processo multifatorial que inclui etapas fundamentais como a maturação citoplasmática e nuclear, sabe-se que sem a adequada maturação do oócito o desenvolvimento embrionário não acontecerá. Vários fatores influenciam na aquisição de qualidade oocitária. Entretanto, um adequado microambiente folicular é um fator determinante para que o oócito tenha sucesso, seja *in vivo* ou *in vivo*, no crescimento, na maturação, na fertilização, no desenvolvimento embrionário inicial e até na implantação, no crescimento fetal e no nascimento de um produto saudável (KRISHER, 2013).

7. CONCLUSÃO

Os triacilglicerídeos principalmente contendo os ácidos graxos: oleico, linoleico, esteárico aparecem em maiores concentrações em líquido folicular e células do folículo dos grupos em que os oócitos tiveram maior potencial ao desenvolvimento. O perfil lipídico do líquido folicular é, no entanto, complexo com grande variedade de triacilgliceróis, fosfatidilcolinas, esfingomielinas, monoacildiacilglicerídeos, N-Acilfosfatidiletanolaminas, cardiolipinas.

Neste estudo, demonstramos que o perfil lipídico do líquido folicular bovino e das células do ambiente folicular dos diferentes grupos experimentais apresentam diferenças.

Tendo em vista a relação direta do potencial de desenvolvimento estimada pelo estudo retrospectivo realizado neste trabalho concluímos que alguns lipídios como as cardiolipinas (669,4 m/z e 697,5 m/z) monoacildiacilglicerol (822,8 m/z), esfingomielinas (733,6 m/z , 815,8 m/z) e GT2 (904,9 m/z) N-Acilfosfatidiletanolamina (1087,8 m/z), fosfatidilcolinas (782,6 m/z e 732,6 m/z) e fosfatidilinositol (669,4 m/z) demonstraram possuir potencial de biomarcadores de qualidade oocitária no líquido folicular bovino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARDEMA, H.; VOS, P. L. A. M.; LOLICATO, F.; ROELEN, B. A. J.; KNIJN, H. M.; VAANDRAGER, A. B.; HELMS, J. B.; GADELLA, B. M. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v.85, p. 62–69, 2011.

ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction Development**, v.61, p. 57–66, 2002.

AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in domestic animals (Zuchthygiene)**, v. 45, n. 1, p. 171–9, 2010.

ALBERTINI, D. F.; SANFINS, A.; COMBELLES, C. M. Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. **Reproduction Biomed Online**, Cambridge, v.6, p.410-415, 2003.

ALI, A.; SIRARD, M.A. Protein Kinases influence bovine oocyte competence during short-term treatment with recombinant human follicle stimulating hormone. **Reproduction. Cambridge**, v.130, p. 303-310, 2005.

ANTONIOLLI, C. B. Seminário apresentado na disciplina de Endocrinologia da Reprodução. Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS, Porto Alegre, 2002.

ARAKI, N.; SATO, K.; HAYASHI, K.; MIYAMOTO, A.; FUKUI, Y. Relationships among follicular fluid estradiol-17 β concentration, morphology of cumulus-oocyte complex and developmental capacity of individually matured, fertilized and cultured bovine oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Development**, v.44.4, p.359-365, 1998.

ASSIDI, M.; DIELEMAN, S. J.; SIRARD, M. A. Cumulus cell gene expression following the LH surge in bovine preovulatory follicles: potential early markers of oocyte competence. **Reproduction**, v. 140, p. 835–852, 2010.

AUGER, K. R.; CARPENTER, C. L.; CANTLEY, L. C.; VARTICOVSKI, L. Phosphatidylinositol 3-kinase and its novel product, phosphatidylinositol 3-phosphate,

are present in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n.34, p. 20181-20184, 1989.

BARNES, F. L.; ENDEBROCK, M.; LOONEY, C.; POWELL, R.; WESTHUSIN, M.; BONDIOLI K. Embryo cloning in cattle: the use of in vitro matured oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge, v.97, p.317-320, 1993.
BEATTY, R. A. **Parthenogenesis and polyploidy in mammalian development**. Cambridge: Cambridge University Press, 1957.

BENDER, K.; WALSH, S.; EVANS, A. C. O.; FAIR, T.; BRENNAN, L. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. **Reproduction Research**. n. 139, p. 1047-55, 2010.

BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J.; VAN DER HURK R. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v.47, p.13-22, 1997

BIASE, F. H.; MARTELLI, L.; MERIGHE, G. K. F.; BIASE, W. K. F. S.; MIRANDA, M.; SMITH, L. C.; MEIRELLES, F. V. A retrospective model of oocyte competence: global mRNA and housekeeping transcripts are not associated with in vitro developmental outcome. **Zygote**, v. 17, n. 4, p. 289–95, 2009.

BLIGH, E.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 8, p. 911-917, 1959.

BLONDIN, P.; GUIBAULT, L.; SIRARD, M. A. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. **Theriogenology**, v.48, p.803–813, 1997.

BOUL KHALIL, M.; HOU, W.; ZHOU, H.; ELISMA, F.; SWAYNE, L. A.; BLANCHARD, A. P.; YAO, Z.; KHALIL, M. B.; FIGEYS, D. Lipidomics era : accomplishments and challenges. **Wiley Online Library**, v. 29, n. 6, p. 877-929, 2010.

BURATINI JR, J.; TEIXEIRA, A. B.; COSTA, I. B.; GLAPINSKI, V. F.; PINTO, M. G. L.; GIOMETTI, I. C.; BARROS, C. M.; CAO, M.; NICOLA, E. S.; PRICE, C. A. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. **Reproduction**, v. 130, p. 343-50, 2005.

BYSKOV, A. G.; ANDERSEN, C. Y.; NORDHOLM, L.; THOGERSEN, H.; GUOPLIANG, X.; WASSMANN, O.; ANDERSERN, J. V.; GUDDAL, E.; ROED, T. Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. **Nature**, p. 559-562, 1995.

CAIXETA, E. S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M. M.; JUNIOR, J. B.; DODE, M. A. N. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence.

Reproduction, Fertility and Development, v. 5, p. 655-664, 2009.

CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; SÁ, W. F.; FERREIRA A. M.; RAMOS, A. A.; VALE FILHO, V. R. Factors influencing in vitro embryo production. **Animal Reproduction**, v.3, n.1, p.19-28, 2006.

CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 296, p. 1655–1657, 2002.

CARNEIRO, G.; LORENZO, P.; PIMENTEL, C.; PEGORARO, L.; BERTOLINI, M.; BALL, B.; ANDERSON, G.; LIU, I. Influence of insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on in vitro maturation and parthenogenetic development in equine oocytes. **Biology Reproduction**, 65, 899–905, 2001.

CARNEIRO, G. F. Biotecnologia da reprodução na espécie caprina: perspectivas atuais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.268-273, 2007.

CETICA, P.; PINTOS, L.; DALVIT, G.; BECONI, M. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. **Reproduction**, v.124, p.675-681, 2002.

CHAVES, R. N.; FIGUEIREDO, J. R. Sistemas de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 37–49, 2010.

CHEN, J.; TORCIA, S.; XIE, F.; LIN, C. J.; ÇAKMAK, H.; FRANCIOSI, F.; HORNER, K.; ONODERA, C.; SONG, J. S.; CEDARS, M. I.; SANTOS, M. R.; CONTI, M. Somatic cells regulate maternal mRNA translation and developmental competence of mouse oocytes. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 1415–1423, 2013.

CHIARATTI, M. R.; BRESSAN, F. F.; FERREIRA, C. R.; CAETANO, A. R.; SMITH, L. C.; VERCESI, A. E.; MEIRELLES, F. V. Embryo mitochondrial DNA depletion is reversed during early embryogenesis in cattle. **Biology of reproduction**, v. 82, n. 1, p. 76–85, 2010.

CHOI, W.J.; BANERJEE, J.; FALCONE, T.; BENA, J.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.K.. Oxidative stress and tumor necrosis factor-alpha-induced alterations in metaphase II mouse oocyte spindle structure. **Fertility and Sterility**, v.88, p. 1220-1231, 2007.

COLLADO-FERNANDEZ, E.; PICTON, H. M.; DUMOLLARD, R. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. **The International journal of developmental biology**, v. 56, n. 10-12, p. 799–808, 2012.

COLLAS, P.; CHANG, T.; LONG, C.; ROBL, J. M. Inactivation of histone H1 kinase by CA2+ in rabbit oocytes. **Molecular Reproduction Development**, v.40, p.253-258, 1995.

COLLAS, P.; SULLIVAN, E. J.; BARNES, F. L. Histone H1 Kinase activity in bovine oocytes following calcium stimulation. **Molecular Reproduction Development**, v.34, p.224-231, 1993.

COMBELLES, C. M. H.; HOLICK, E. A; PAOLELLA, L. J.; WALKER, D. C.; WU, Q. Profiling of superoxide dismutase isoenzymes in compartments of the developing bovine antral follicles. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 139, n. 5, p. 871–81, 2010.

COTICCHIO, G., SERENI, E., SERRAO, L., MAZZONE, S., IADAROLA, I., BORINI, A. What criteria for the definition of oocyte quality? **Annals of New York Academic Science, New York**, v. 1034, p. 132-144, 2004.

DE BEM, T.H.C. **Efeito da pré-maturação sobre o desenvolvimento embrionário de oócitos submetidos à ativação partenogenética e transferência de núcleo**. 2009. 95f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

DE SOUSA, P. A; DOBRINSKY, J.R; ZHU, J.; ARCHIBALD, AL; AINSLIE, A.; BOSMA, W.; BOWERING, J.; BRACKEN, J.; FERRIER, P.M.; FLETCHER, J.; GASPARRINI, B.; HARKNESS, L.; JOHNSTON, P.; RITCHIE, M.; RITCHIE, W.A.; TRAVERS, A.; ALBERTINI, D.; DINNYES, A.; KING, T.J.; WILMUT, I. Somatic cell nuclear transfer in the pig: control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. **Biological Reproduction**. v.66, n.3, p.642-50, 2002.

DICKSON, R. C.; LESTER, R. L. Yeast sphingolipids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, n. 1426, v. 2, p. 347-357, 1999.

ELVIN, J. A.; YAN, C.; MATZUK, M. M. Oocyte-expressed TGF- β superfamily members in female fertility. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.159, p.1–5, 2000.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, p. 829–838, 2001.

EPPIG, J. J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F. L. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 99, p. 2890–2894, 2002.

EVANS, A C. O.; MOSSA, F.; WALSH, S. W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; IRELAND, J. J. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. **Reproduction in domestic animals**, v. 47 Suppl 4, p. 31–7, 2012.

FAHY, E.; COTTER, D.; SUD, M.; SUBRAMANIAM, S. Lipid classification, structures and tools. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1811, n. 11, p. 637–47, 2011.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal reproduction science**, v. 78, n. 3-4, p. 203–216, 2003.

FALKENBURGER, B. H.; JENSEN, J. B.; DICKSON, E. J.; SUH, B.-C.; HILLE, B. Phosphoinositides: lipid regulators of membrane proteins. **The Journal of physiology**, v. 588, n. Pt 17, p. 3179–85, 2010.

FERGUSON, E.M.; LEESE, H.J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. **Jornal Reproduction Fertil**, v.116, p.373-378, 1999.

FERREIRA, C. R.; SARAIVA, S. A.; GARCIA, J. S.; SANVIDO, G. B.; PERECIN, F.; CATHARINO, R. R.; SIMAS, R. C.; GOZZO, F. C.; SANTOS, L. F. A.; MARTINS Junior, H.; BASSO, A. C.; PONTES, J. H. F.; MEIRELLES, F. V.; COELHO, M. B.; D'ANGELO, M.; EBERLIN, M, N. 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 109, p. 109–136, 2009.

FERREIRA, C. R.; SARAIVA, S. A.; CATHARINO, R. R.; GARCIA, J. S.; GOZZO F. C.; SANVIDO, G. B.; SANTOS, L. F.; LO TURCO, E. G.; PONTES, J. H.; BASSO, A. C.; BERTOLLA, R. P.; SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M. M.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F. V.; SANGALLI, J. R.; EBERLIN, M. N. Single embryo and oocyte

- lipid fingerprinting by mass spectrometry. **Jornal of Lipid Research**, v. 51, n.5, p.1218-27, 2010.
- FERREIRA, C. R.; EBERLIN, L. S.; HALLETT, J. E.; COOKS, R.C. Single oocyte and single embryo lipid analysis by desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v.47, p. 29–33, 2012.
- FERREIRA, C.R.; PIRRO, V.; EBERLIN, L.S.; HALLETT, J.E.; COOKS, R.G. Developmental phases of individual mouse preimplantation embryos characterized by lipid signatures using desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, v. 404, nº10, p. 2915-2926, 2012.
- FIGUEIREDO J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, 2.ed. São Paulo: Roca, p.303-327, 2008.
- FISSORE, R. A.; KUROKAWA, M.; KNOTT, J.; ZHANG, M.; SMYTH, J. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. **Reproduction**, v.124, p.745-754, 2002.
- FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v.50, p. 225-232, 1994.
- FORTUNE, J. E.; KITO, S.; WANDJI, S. A.; SRSEN, V. Activation of bovine and baboon primordial follicles in vitro. **Theriogenology**, v.49, p.441–449, 1998.
- FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.78, p. 135–163, 2003.
- FUCHS, B.; SCHILLER, J.; SÜß, R.; ZSCHARNACK, M.; BADER, A.; MÜLLER, P.; SCHÜRENBERG, M.; BECKER, M.; SUCKAU, D. Analysis of stem cell lipids by offline HPTLC-MALDI-TOF MS. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 392, n. 5, p. 849-860, 2008.
- GARDNER D. K. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. **Cell Biological**, v.18, p.1163-1179, 1994.

GHOSH, S. U. J. O. Y.; STRUM, J. C.; BELL, R. M. Lipid biochemistry: functions of glycerolipids and sphingolipids in cellular signaling. **The FASEB journal**, v.11, n.1, p. 45-50, 1997.

GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v.67, n.1, p.6-15, 2007.

GILCHRIST, R. B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to in vitro maturation. **Reproduction Fertility Development**, v. 23, p. 23-31, 2011.

GÓMEZ, E.; RODRÍGUES, A.; MUÑOZ, M.; CAAMAÑO, J. N.; HIDALGO, C. O.; MORÁN, E.; FACAL, N.; DÍEZ, C. Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. **Theriogenology**, v.69, p.1013-1021, 2008.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2Ed., Roca, 2008.

GONZÁLEZ-SERRANO, A. F.; PIRRO, V.; FERREIRA, C. R.; OLIVERI, P.; EBERLIN, L. S.; HEINZMANN, J.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, N.; COOKS, R. G. Desorption electrospray ionization mass spectrometry reveals lipid metabolism of individual oocytes and embryos. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e74981, 2013.

GOOVAERTS, I.G.; LEROY, J.L.; VAN SOOM, A.; DE CLERCQ, J.B.; ANDRIES, S.; BOLS, P.E. Effect of cumulus cell coculture and oxygen tension on the in vitro developmental competence of bovine zygotes cultured singly. **Theriogenology**, v.74, n°9, p.1509-1520, 2009

GOOVAERTS, I. G.; LEROY, J. L.; JORSSSEN, E. P.; BOLS, P. E. Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p. 1509-1520, 2010.

GOOVAERTS, I.G.; LEROY, J.L.; RIZO, S. D.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; JORSSSEN, E.P.; BOLS, P.E. Single in vitro bovine embryo production: coculture with autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and gene expression profiles. **Theriogenology**, v.76, p. 1293-1303, 2011.

GOOVAERTS, I.G.; LEROY, J.L.; LANGBEEN, A.; JORSSSEN, E.P.; BOSMANS, E.; BOLS, P.E. Unravelling the needs of singly in vitro-produced bovine embryos: from cumulus cell co-culture to semi-defined, oil-free culture conditions. **Reproduction Fertility Developmental**, v.24, n°8, p.1084-1092, 2012.

GOPICHANDRAN, N.; LEESE, H. J. The effect of paracrine/autocrine interactions on the in vitro culture of bovine preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 131, p. 269–277, 2006.

GORDON I. **Laboratory production of cattle embryos**. Wallingford, UK: CABI International, 640p, 1994.

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.2, p.82-94, 2009.

GRUPEN, C. G.; NOTTLE, M. B.; NAGASHIMA, H. Calcium release at fertilization: artificially mimicking the oocytes response to sperm. **Journal of Reproduction and Development**, v. 48, n. 4, 2002.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7Ed., Manole, Barueri, SP, 2004.

HAGGARTY, P.; WOOD, M.; FERGUSON, E.; HOAD, G.; SRIKANTHARAJAH, A.; MILNE, E.; HAMILTON, M.; BHATTACHARYA, S. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. **Human Reproduction**, v. 21, p. 766–773, 2006.

HAJNÓCZKY, G.; DAVIES, E.; MADESH, M. Calcium signaling and apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications, Orlando**, n. 304, p. 445-454, 2003.

HARKEWICZ, R.; DENNIS, E. A. Applications of mass spectrometry to lipids and membranes. **Annual review of biochemistry**, v. 80, p. 301–25, 2011.

HAYASAKA, T.; GOTO-INOUE, N.; ZAIMA, N.; KIMURA, Y.; SETOU, M. Organ-specific distributions of lysophosphatidylcholine and triacylglycerol in mouse embryo. **Lipids**, v. 44, n. 9, p. 837-848, 2009.

HENNET, M. L.; COMBELLES, C. M. H. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. **The International journal of developmental biology**, v. 56, n. 10-12, p. 819–31, 2012.

HENNET, M. L.; HOPE, Y. Y.; COMBELLES, C. M. H. Follicular fluid hydrogen peroxide and lipid hydroperoxide in bovine antral follicles of various size, atresia, and dominance status. **Journal of assisted reproduction and genetics**, p. 1-8, 2013.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p. 23-32, 1997.

IKONOMOV, O. C.; SBRISSE, D.; DELVECCHIO, K.; XIE, Y.; JIN, J. P.; RAPPOLEE, D.; SHISHEVA, A. The phosphoinositide kinase PIKfyve is vital in early embryonic development: Preimplantation lethality of PIKfyve^{-/-} embryos but normality of PIKfyve^{+/-} mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 15, p. 13404-13413, 2011.

JAMNONGJIT, M.; HAMMES, S. R. Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. In: **Seminars in reproductive medicine**. NIH Public Access, p. 234, 2005.

JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T.; PRU, J. K.; TILLY, J.L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**, v. 428, p.145-50, 2004.

JONES, K.; T. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v.10, p.1-5, 2004.

JOZWIK, M.; JOZWIK, M.; TENG, C.; BATTAGLIA, F.C. Amino acid, ammonia and urea concentrations in human pre-ovulatory ovarian follicular fluid. **Human Reproduction**, v.21, n.11, p. 2776-2782, 2006.

KIKUCHI, K.; NAITO, K.; NOGUCHI, J.; SHIMADA, A.; KANEKO, H.; YAMASHITA, M.; AOKI, F.; TOJO, H.; TOYODA, Y. Maturation/M-Phase Promoting Factor: A Regulator of Aging in Porcine Oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 3, p. 715-722, 2000.

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

KLINE, D.; KLINE, J. Repetitive calcium transients and rate of calcium in exocytosis and cell activation in the mouse eggs. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 42, suppl., p. 80-89, 1990.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.165–183, 2003.

KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **Journal Animal Science**, v.82, p. 14–23, 2004.

KRISHER, R. L.; WHEELER, M. B. Towards the use of microfluidics for individual embryo culture. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 1, p. 32-39, 2009.

KRISHER, R. L. In Vivo and In Vitro Environmental Effects on Mammalian Oocyte Quality. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 1, n. 1, p. 393–417, 2013.

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

KUPKER, W.; DIEDRICH, K.; EDWARDS, R. G. Principles of mammalian fertilization. **Human Reproduction**, Oxford, v. 13. p.20-32, 1998.

LEITÃO, C. C. F.; BRITO, I. R.; FROTA, I. M. A.; SILVA, J. R. V. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n.3, p.215-224, 2009.

LIU, H.; AOKI, F. Transcriptional activity associated with meiotic competence in fully grown mouse GV oocytes. **Zygote**. v.10, n.4, Nov, p.327-32, 2002.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERRES-ADAN, A.; FARIN, T.; BOLAND, M. P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction Domestic Animal**, v. 38, p.259-267, 2003.

MANNIKKO, M.; TORMALA, R. M.; TUURI, T.; HALTIA, A.; MARTIKAINEN, H.; ALA-KOKKO, L.; TAPANAINEN, J. S.; LAKKAKORPI, J. T. Association between sequence variations in genes encoding human zona pellucida glycoproteins and fertilization failure in IVF. **Human Reproduction**, v.20, n.6, p.1578-85, 2005.

MAREI, W. F.; WATHES, D. C.; FOULADI-NASHTA, A. A. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. **Reproduction**, v.139, p. 979-988, 2010.

MATOKA, S.; FAIR, T.; LONERGAN, P. Maturation, fertilization and culture of bovine oocytes and embryos in an individually identifiable manner: a tool for studying oocyte developmental competence. **Reproduction Fertility Developmental**, v.22, n°5, p.839-851, 2010.

MATOKA, S.; BENDER, K.; FAHEY, A.G.; MAMO, S.; BRENNAN, L.; LONERGAN, P.; FAIR, T. Predictive value of bovine follicular components as markers of oocyte developmental potential. **Reproductive Fertility Developmental**, 2013.

McEVOY, T.; COULL, G.; BROADBENT, P.; HUTCHINSON, J.; SPEAKE, B. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 118, v. 163-170, 2000.

McKEEGAN, P. J; STURMEY, R. G. The role of fatty acids in oocyte and early embryo development. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 24, n. 1, p. 59-67, 2011.

MEHLMANN, L. M.; JONES, T. L.; JAFFE, L. A.; Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. **Science**, Washington, v. 297, p. 1343-1345, 2002.

MEINECKE, B.; JANAS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reproduction of Domestic Animal**, v.36, p.183-188, 2001.

MEIRELLES, F. V.; CAETANO, A. R.; WATANABE, Y. F.; RIPAMONTE, P.; MÉO, S. C., LEAL, C. L. V., GARCIA, J. M. Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.81, p.35-46, 2004.

MÉO, S.C., LEAL, C.L.V., GARCIA, J.M. Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated with ethanol and strontium. **Animal Reproduction Science**. Amsterdam, v.81, p.35-46, 2004.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 h culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, p. 89–95, 2000.

MINGOT, G. Z.; GARCIA, J. M.; ROSA e SILVA; A. A. M. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte complexes matured in vitro with BSA and

different concentrations of steroids. **Animal Reproduction Science**, v.69, p.175-186, 2002.

MIYAZAKI, S. Cell signaling at fertilization of hamster eggs. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, v. 42, suppl., p. 163-175, 1990.

MOTTA, G. B. **Desenvolvimento e expressão gênica em oócitos bovinos imaturos selecionados por Azul Cresil Brilhante**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa. 2008.

MURPHY, R.C.; RAETZ, C.R; REYNOLDS, C.M.; BARKLEY, R.M. Mass spectrometry advances in lipidomics: collision-induced decomposition of Kdo2-lipid A. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v.77, p.131-140, 2005.

NILSSON, E.; PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.175, p.123–130, 2001.

NILSSON, E.; SKINNER, M. K. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v.8, p.17–20, 2001.

NUSSBAUM, D. J.; PRATHER, R. S. Differential-Effects of Protein-Synthesis Inhibitors on Porcine Oocyte Activation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 41, n. 1, p. 70-75, 1995.

OKTEM, O.; OKTAY, K. The ovary: anatomy and function throughout human life. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1127, p. 1–9, 2008.

ORESIC, M.; HÄNNINEN, V. A.; VIDAL-PUIG, A. Lipidomics: a new window to biomedical frontiers, **Trends in Biotechnology**, v.26, p. 647–652, 2008.

ORSI, N. M; GOPICHANDRAN N.; LEESE, H. J.; PICTON, H. M.; HARRIS, S. E. Fluctuations in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrous cycle. **Reproduction**, v. 129, p. 219-228, 2005.

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

- OYAMADA, T.; IWAYAMA, H.; FUKUI, Y. Additional effect of epidermal growth factor during in vitro maturation for individual bovine oocytes using a chemically defined medium. **Zygote**, v.12, p.143–50, 2004.
- PALMA, G. A.; ARGANÁRAZ, M. E.; BARRERA, A. D.; RODLER, D.; MUTTO, A. A.; SINOWATZ, F. Biology and biotechnology of follicle development. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.
- PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Kit ligand on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p.55-64, 2000.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAM, G. M.; KRIZ, G. S. **Introdução a Espectroscopia**, 4ª Ed. São Paulo:CENGAGE, 716p, 2010.
- PAYTON, R. R.; ROMAR, R., COY, P., SAXTON, A. M, LAWRENCE, J. L, EDWARDS, J. L. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 4, p. 1303-1308, 2004.
- PINERO-SAGREDO, E.; NUNES, S.; LOS SANTOS, M. J. DE; CELDA, B.; ESTEVE, V. N. M. R. Metabolic profile of human follicular fluid. **NMR in Biomedicine**, v. 23, n. 5, p. 485-95, 2010.
- PORCIUNCULA, P. M. **Ativação partenogênética de oócitos bovinos jovens com ionomicina e 6-dimetilaminopurina associado ou não ao estrôncio**. Dissertação. Pirassununga-SP, 2007.
- REVELLI, A.; PIANE, L. D.; CASANO, S.; MOLINARI, E.; MASSOBRIO, M.; RINAUDO, P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 7, n. 40, p. 4330-7, 2009.
- ROBERT, C.; GAGNE, D.; BOUSQUET, D.; BARNES, F. L.; SIRARD, M. A. Differential display and suppressive subtractive hybridization used to identify granulosa cell messenger RNA associated with bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1812–1820, 2001.
- ROTH, Z., HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1898-1906, 2004.

- ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**, v.129, p.235-244, 2005.
- RUSSEL, D. F.; BAQIR, S.; BORDIGNON, J.; BETTS, D. H. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.1255-1270, 2006.
- SARAIVA, S. A.; CABRAL, E. C.; EBERLIN, M. N.; CATHARINO, R. R. Amazonian Vegetable Oils and Fats: Fast Typification and Quality Control via Triacylglycerol (TAG) Profiles from Dry Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Fingerprinting. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 10, p. 4030-4034, 2009.
- SCHILLER, J.; ARNHOLD, J.; BENARD, S.; MÜLLER, M.; REICHL, S.; ARNOLD, K. Lipid analysis by matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry: A methodological approach. **Analytical biochemistry**, v. 267, n. 1, p. 46–56, 1999.
- SCHILLER, J.; MÜLLER, K.; SUSS, R.; ARNHOLD, J.; GEY, C.; HERRMANN, A.; LESSIG, J.; ARNOLD, K.; MÜLLER, P. Analysis of the lipid composition of bull spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry – a cautionary note. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 126, p. 85–94, 2003.
- SENEDA, M. M.; BORDIGNON, V. Novos conceitos em foliculogênese. **Pubvet**, v. 1, n. 8, ed. 8, art. 118, p. 1982-1263, 2007.
- SHIN, M. R.; KIM, N. H. Maternal gamma (g)-tubulin is involved in microtubule reorganization during bovine fertilization and parthenogenesis. **Molecular Reproduction and Development**, v.64, p.438-445, 2003.
- SINCLAIR, K. D.; LUNN, L. A.; KWONG, W.Y.; WONNACOTT, K.; LINFORTH, R. S.; CRAIGON, J. Amino acid and fatty acid composition of follicular fluid as predictors of in vitro embryo development. **Reproductive Biomedicine Online**, v.16, p. 859–868, 2008.
- SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v.49, p.483-497, 1998.
- SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v.55, p.1241-1254, 2001.
- SIRARD, M. A.; DUFORT, I.; COENEN, K.; TREMBLAY, K.; MASSICOTTE, L.; ROBERT, C. The use of genomics and proteomics to understand oocyte and early embryo functions in farm animals. **Reproduction Supplement**, London, v. 61, p. 117-129, 2003.

SOUZA, M. R; COSTA, E. P; TORRES, C. A. A.; GUIMARÃES, J. D.; FAGUNDES, L. M. Vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos utilizando etilenoglicol associado à trehalose e polivinil pirrolidona. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n.5, p. 580-587, 2003.

SOYAL, S. M.; AMLEH, A.; DEAN, J. FIGalpha, a germ cell- specific transcription factor required for ovarian follicle formation. **Development**, v. 127, p. 4645–4654, 2000.

SPIEGEL, S. Sphingosine 1-phosphate: a prototype of a new class of second messengers. **Journal of leukocyte biology**, v.65, n. 3, p. 341-344, 1999.

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

STURMEY, R.G; REIS, A.; LEESE, H.J.; McEVOY, T.G. Role of fatty acids energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reproduction Domestic Animal**, v.44, p.50-58, 2009.

SUDANO, M. J.; SANTOS, V. G.; TATA, A.; et al. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 6, p. 130, 2012.

SUN, X. F; WANG, W. H.; KEEFE, D. L. Overheating is detrimental to meiotic spindles within in vitro matured human oocytes. **Zygote**, v.12, p.65-70, 2004.

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; MIWA, I.; TANIGUCHI, K.; MAEKAWA, R.; ASADA, H.; TAKETANI, T.; MATSUOKA, A.; YAMAGATA, Y.; SHIMAMURA, K.; MORIOKA, H.; ISHIKAWA, H.; REITER, R. J.; SUGINO, N. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. **Journal of Pineal Research**, v. 44, p. 280-287, 2008.

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M.; DE KRUIF, A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 414-424, 2002.

TETZNER, T. A. D. **Fontes protéicas alternativas utilizadas nos meios de cultivo durante a produção *in vitro* de embriões bovinos**. Tese (doutorado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 170f. Jaboticabal, 2011.

THOMPSON, J. G.; GARDNER, D. K.; PUGH, P. A.; MCMILLAN, W. H.; TERVIT, H. R. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* pré-elongation development of ovine embryos. **Biology Reproduction**, v. 53, p. 1385-1391, 1995.

TSAI, M. J.; O'MALLEY, B. W. Molecular mechanisms of action of steroid/ thyroid receptor superfamily members. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, p.451– 486, 1994.

TSUJII, H.; KHANDOKER, M. A. M. Y.; HAMANO, K. I. Lipid in mammalian embryo development. **Journal of Mammalian Ova Research**, v.18, p. 73–80, 2001.

VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 112–124, 2008.

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

WALLACE, M.; COTTELL, E.; GIBNEY, M.J.; McAULIFFE, F.M.; WINGFIELD, M.; BRENNAN, L. An investigation into the relationship between the metabolic profile of follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome. **Fertil Steril**, v.97, nº5, p.1078-1084, 2012.

WANG, W.; DAY, B. N.; WU, G. How does polyspermy happen in mammalian oocytes? **Microscopy Research and Technique**, v. 61, p. 335-341, 2003.

XU, K. P; BRACKET, B. G. A detailed analysis of early events during *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. **Journal of Reproduction Fertility**, v.82, p.127-134, 1988.
YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.;PRESICCE, G.A. Control of oocyte maturation in cows-biological factors. **Theriogenology**, v.49, p471-472, 1998.

YETUKURI, L.; EKROOS, K.; VIDAL-PUIG, A.; OREŠIČ, M. Informatics and computational strategies for the study of lipids, **Molecular BioSystems**, v. 4, n. 2, p. 121-127, 2008.

YOUNIS, A. I.; BRACKETT, B. G. Thyroid stimulating hormone enhancement of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v.2, p.44-51, 1992.