

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SUPLEMENTOS NA
MATURAÇÃO OOCITÁRIA SOBRE O ACÚMULO DE
LIPÍDEOS CITOPLASMÁTICOS EM OÓCITOS E EMBRIÕES
BOVINOS CULTIVADOS *IN VITRO***

Maite del Collado Barrondo

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SUPLEMENTOS NA
MATURAÇÃO OOCITÁRIA SOBRE O ACÚMULO DE
LIPÍDEOS CITOPLASMÁTICOS EM OÓCITOS E EMBRIÕES
BOVINOS CULTIVADOS *IN VITRO*

Maite del Collado Barrondo

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia

Co-Orientadora: Dra. Naiara Zoccal Saraiva

Co-Orientadora: Dra. Flavia Lombardi Lopes

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2013

Del Collado, Maite
B277i Influência de diferentes suplementos na maturação oocitária sobre
o acúmulo de lipídeos citoplasmáticos em oócitos e embriões bovinos
cultivados *in vitro* / Maite del Collado. – – Jaboticabal, 2013
x, 90 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientador: Joaquim Mansano Garcia
Co-orientadores: Flavia Lombardi Lopez e Naiara Zoccal Saraiva
Banca examinadora: Joaquim Mansano Garcia, Gisele Zoccal
Mingoti e Felipe Perecin
Bibliografia

1. Albumina sérica bovina (BSA). 2. Lipídeos. 3. Maturação *in vitro*
(MIV). 4. Soro fetal bovino (SFB). 5. Produção *in vitro* de embriões
PIVE) I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.

e-mail: delcollado@hotmail.com.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SUPLEMENTOS NA MATURAÇÃO OOCITÁRIA
SOBRE O ACÚMULO DE LIPÍDEOS CITOPLASMÁTICOS EM OÓCITOS E EMBRIÕES
BOVINOS CULTIVADOS *in vitro*

AUTORA: MAITE DEL COLLADO BARRONDO

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. NAIARA ZOCCAL SARAIVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA
VETERINÁRIA, Área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de
Araçatuba

Prof. Dr. FELIPE PERECIN

Universidade de São Paulo / Pirassununga/SP

Data da realização: 05 de julho de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MAITE DEL COLLADO BARRONDO- nascida no município de Galdakao, Bizkaia, Espanha, aos 9 dias do mês de maio de 1986, concluiu o ensino médio em Ibaizabal Ikastola, na cidade de Durango, Bizkaia, Espanha, no mês de junho de 2004. Ingressou do curso de graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária de Zaragoza, Universidad de Zaragoza, em setembro de 2004 e concluiu, em junho de 2009. Ingressou, em março de 2011, no programa de Pós-Graduação, ao nível de mestrado, sob orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia e co-orientação da Dra. Flavia Lombardi Lopes e da Dra. Naiara Zoccal Saraiva, no Programa de Medicina Veterinária Área de Concentração em Reprodução Animal, na FCAV –UNESP de Jaboticabal, com bolsa de mestrado da CAPES

“O futuro tem muitos nomes. Para os fracos é o inatingível.

Para os medrosos, o desconhecido.

Para os corajosos é a oportunidade.”

Víctor Hugo

DEDICATORIA

Existe a pessoa, que além da vida, nunca deixou de me ensinar e indicar o caminho que devo seguir.

Pelo ensino infinito, dedicação e amor incondicional que sempre me demonstrou.

Dedico essa dissertação a quem jamais deixou de acreditar em mim, quem me proporcionou lembranças das quais tiro e tirarei forças para enfrentar qualquer obstáculo. Por me ensinar que lutar por um sonho é lutar pela vida.

Porque se existem anjos da guarda, ele é o meu.

Dedico esse trabalho a meu sempre amado pai, Jose M^a del Collado.

Aos meus amores, minhas pessoas neste mundo, ao meu TUDO.

Dedico a minha mãe e irmão, Catalina Barrondo e Jon del Collado. Por serem meus exemplos de vida, de coragem e força. Por me ensinar que cada ferida neste caminho é aprendizado para o próximo, e que não existe maior força que a força da família. Por nunca me deixarem desistir do meu sonho e por participar sempre dele.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Joaquim Mansano Garcia, pela oportunidade de descobrir esse sonho. Pela confiança e animo demonstrados durante o desenvolvimento desse trabalho.

À Naiara Zoccal Saraiva, mais que uma co-orientadora, a minha “mãe científica”. Meu exemplo de pesquisadora apaixonada e ética, sem duvida, a melhor professora que já tive. Obrigada por sempre estar do meu lado, por me ensinar e pelo seu esforço e dedicação extrema.

À Flavia Lombardi Lopes, minha também co-orientadora, pelo apoio incondicional e por sempre acreditar nesse trabalho.

À Roberta Vantini, por ir além do dever de uma técnica e me ajudar sempre com a maior dedicação.

À Roberta Cordeiro Gaspar, companheira e amiga de mestrado. Sempre presente nos momentos que precisei, especialmente na última etapa do mestrado com o experimento de expressão gênica.

Ao meu companheiro e amigão Guilherme Fazam Rossi. Por me ajudar no profissional e pessoal. Parte importante no experimento de maturação *in vivo*, meu agradecimento.

Às também co-autoras, Luciana Cristina Padilha e Roberta Rosales Costa, porque sem a ajuda de vocês jamais teria conseguido.

Aos meus colegas Clara Slade, Luciana Diniz, Marina Ragagnin, Helena Cruz, Danilas Salinet Melo etc. Em algum momento todos eles me ajudaram.

Aos muitos estagiários que passaram pelo laboratório nesses anos e me ajudaram sempre com a maior vontade e dedicação.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal da UNESP-FCAV, especialmente a Edson e Ivo, por alegrar e fazer mais leve cada dia de trabalho.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal da UNESP-FCAV, pelos ensinamentos e experiências.

Ao meu professor da graduação, Antonio Vega, por me abrir as portas nesse país e me dar a oportunidade de vir fazer estágio. Por que graças a ele eu consegui tudo aqui, agradeço.

À minha família brasileira, Laryssa Ribeiro, Elza Aparecida de Freitas e João Ulisses Ribeiro. Por me abrir as portas da sua casa e me fazer sentir parte dela. Meu eterno amor e agradecimento a esta maravilhosa família que sempre levarei comigo.

À minhas amigas da alma, Ane Ereño, Gorane Loroño e Naia Sagarminada. Porque a distancia nunca foi desculpa para a gente. Muito obrigada pela amizade e apoio nesses anos.

Às moradoras e agregadas da Rep. As Coyotes, por suportar firmes minhas angustias e por comemorar sempre minhas conquistas. Por fazer de cada final de semana, feriado e férias uma aventura que jamais esquecerei. Por me demonstrar que, até nos piores momentos, “amigo é base quando falta o chão”. Em especial, agradeço a Mury e Selvis, que junto a Lary foram minhas irmãs nessa república, não existem palavras para agradecer todo o que vocês fizeram por mim ao longo desse mestrado, muito obrigada.

À minha família, por todo o apoio e animo incondicional que sempre me deram, indispensáveis para a conclusão dessa dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

E a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xv
ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Produção <i>in vitro</i> (PIV) de embriões bovinos.....	3
2.2 Maturação oocitária.....	4
2.3 Suplementação proteica na MIV.....	8
2.4 Metabolismo das gotas lipídicas citoplasmáticas.....	10
2.5 Função e comportamento das gotas lipídicas no oócito e embrião.....	15
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4. HIPÓTESES.....	18
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5.1 Local do experimento.....	18
5.2 Produtos.....	18
5.3 Delineamento experimental.....	19

5.4	Experimento I: Quantificação e análise do perfil lipídico do SFB e cálculo do teor lipídico dos meios de MIV.....	19
5.4.1	Cromatografia gasosa do SFB.....	19
5.4.2	Determinação do teor lipídico dos meios de MIV.....	20
5.5	Experimento II. Efeitos da suplementação com SFB, BSA e sua combinação durante a MIV sobre a maturação oocitária.....	21
5.5.1	Obtenção dos ovários.....	21
5.5.2	Obtenção e seleção dos complexos de células do <i>cumulus</i> e oócitos (COCs).....	21
5.5.3	Maturação <i>in vitro</i>	22
5.5.4	Avaliação da maturação nuclear e da distribuição de grânulos corticais (GC) como indício de maturação citoplasmática.....	22
5.5.5	Avaliação da distribuição das mitocôndrias e gotas lipídicas em oócitos imaturos e submetidos à MIV.....	24
5.5.6	Avaliação mitocondrial e das gotas lipídicas em oócitos maturados <i>in vivo</i>	28
5.5.6.1	Protocolo de sincronização e superestimulação das vacas doadoras e colheita dos oócitos maturados <i>in vivo</i>	28
5.5.6.2	Avaliação mitocondrial e lipídica dos oócitos colhidos.....	29
5.6	Experimento III: Avaliação do uso de SFB, BSA e combinação de ambos durante a MIV sobre o desenvolvimento embrionário.....	29
5.6.1	Processamento do sêmen e fecundação <i>in vitro</i>	29
5.6.2	Cultivo <i>in vitro</i> de embriões.....	30
5.6.3	Quantificação das taxas de clivagem e de desenvolvimento	

	embrionário.....	30
5.7	Experimento IV: Quantificação lipídica dos embriões produzidos <i>in vitro</i> após MIV em diferentes meios.....	30
5.8	Experimento V: Análise da expressão dos genes <i>DGAT2</i> e <i>PLIN2</i> em células do <i>cumulus</i> , oócitos imaturos e maduros, e embriões produzidos a partir de diferentes meios durante a MIV.....	31
5.8.1	Colheita das amostras.....	31
5.8.2	PCR-RT.....	32
5.9	Análise Estatística.....	33
6.	RESULTADOS	33
6.1	Experimento I: Quantificação e análise do perfil lipídico do SFB e cálculo do teor lipídico dos meios de MIV.....	33
6.2	Experimento II. Avaliação do efeito da suplementação do SFB, BSA e sua combinação durante a MIV sobre a maturação oocitária.....	36
6.2.1	Avaliação da progressão nuclear e migração de grânulos corticais (GC).....	36
6.2.2	Avaliação da distribuição das mitocôndrias e gotas lipídicas em oócitos imaturos e oócitos submetidos à MIV ou maturação <i>in vivo</i>	37
6.2.3	Avaliação da quantidade de mitocôndrias e lipídeos em oócitos imaturos, submetidos à MIV e maturados <i>in vivo</i>	39
6.3	Experimento III: Efeitos do uso de SFB, BSA e combinação de ambos durante a MIV sobre o desenvolvimento embrionário.....	42
6.4	Experimento IV: Quantificação lipídica dos embriões de PIV.....	42
6.5	Experimento V: Análise da expressão dos genes <i>DGAT2</i> e <i>PLIN2</i> em células do <i>cumulus</i> , oócitos imaturos e maduros, e em embriões.....	45
7.	DISCUSSÃO	46

8	CONCLUSÕES.....	55
8	REFERÊNCIAS.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Morfologia da gota lipídica: núcleo composto por lipídeos neutros, envolvidos por uma monocamada de fofolipídeos, colesterol e proteínas (OLOFSSON <i>et al.</i> , 2009).....	11
Figura 2.	Teorias sobre a biossíntese das gotas lipídicas. Enquanto no modelo 1 os lipídeos são sintetizados entre as duas membranas do RE e depois a gota é liberada rodeada pela membrana exterior, no modelo 2 a gota é composta pelas duas membranas do RE. Na última teoria, modelo 3, as gotas são formadas dentro de pequenas vesículas de bicamada que mantem-se presas ao RE por uma janela pela qual os lipídeos serão transportados (WATHER E FARESE, 2009).....	12
Figura 3.	Esquema dos principais acontecimentos durante a β -oxidação. Ácidos graxos são convertidos em acil-CoA graxos, que por sua vez, serão transportados pela carnitina e o receptor de membrana CPT1 até o interior da mitocôndria, onde acontecerá a β -oxidação. Quando há necessidade de lipogênese, o manoil-CoA, precursor da síntese dos ácidos graxos, inibe o CPT1, impedindo a entrada dos ácidos na mitocôndria e sua oxidação.....	14
Figura 4.	Fotomicrografia da progressão nuclear e distribuição dos grânulos corticais em oócitos bovinos. Quanto à avaliação da progressão nuclear, oócitos em MII e com presença do primeiro corpúsculo polar foram considerados maduros (A), enquanto os que se encontravam em outros estádios foram considerados imaturos (B). De acordo com a migração dos grânulos corticais, oócitos com os grânulos corticais na periferia formando um halo (C) foram considerados maduros, e oócitos com presença de “clusters” (D) ou em transição (E), imaturos.....	24
Figura 5.	Fotomicrografica ilustrando diferentes categorias da distribuição mitocondrial e de gotas lipídicas nos oócitos. Quanto às mitocôndrias, quando as mesmas se encontravam dispostas em toda a periferia do citoplasma denominou-se periferia (A), transição (B) quando mesmo aparecendo na maior parte do citoplasma ainda acumulavam-se numa pequena parte da periferia, e disperso (C), quando as mitocôndrias localizavam-se dispersas homogeneamente em todo o citoplasma. Quanto às distribuições das gotas lipídicas, as mesmas foram classificadas entre periferia (D) e disperso (E).....	26

Figura 6.	Processamento da imagem original (A) para a quantificação lipídica mediante o programa ImageJ. Depois de ajustar a escala e passar a imagem para 8 bits (B), as gotas lipídicas são individualizadas com a ferramenta “nucleus counter” (C) para posterior quantificação da área das mesmas.....	27
Figura 7.	Protocolo de sincronização e superestimulação dos animais doadores de oócitos. As vacas foram sincronizadas após aspiração do folículo dominante mediante OPU e a superestimulação realizou-se mediante administração de doses decrescentes de FSH, sendo aplicada uma dose de GnRH 24 horas antes da OPU para a coleta de oócitos maduros.....	28
Figura 8	Imagem representativa de um blastocisto corado com LipidTox Green Nutral Lipid Stain (Molecular Probes).....	31
Figura 9	Gráfico da cromatografia do SFB, onde cada pico refere-se a um ácido graxo e cada área determina a proporção que esse ácido representa na amostra.....	34
Figura 10	Área média de gotas lipídicas (μm^2 de lipídeo/ oócito) em oócitos imaturos, maturados <i>in vitro</i> nos diferentes meios (GBSA: 8mg/mL de BSA-FAF, GSFB: 10%SFB e GB+S: 6mg/ml de BSA-FAF + 5% SFB) e maturados <i>in vivo</i> . As colunas com diferentes letras diferem entre si ($p<0,05$) pelo teste Mann Whitney.....	39
Figura 11	Avaliação da quantidade mitocondrial (intensidade/ oócito) dos oócitos imaturos e maturados <i>in vitro</i> (GBSA: 8mg/mL de BSA-FAF, GSFB: 10%SFB e GB+S: 6mg/ml de BSA-FAF + 5% SFB) e <i>in vivo</i> pela quantificação da intensidade da fluorescência de Mitotracker. As colunas com diferentes letras diferem entre si ($p<0,05$) pelo teste Mann Whitney.....	40
Figura 12	Avaliação do tamanho das gotas lipídicas de oócitos imaturos, maturados <i>in vitro</i> (GBSA: 8mg/mL de BSA-FAF, GSFB: 10%SFB e GB+S: 6mg/ml de BSA-FAF + 5% SFB) e <i>in vivo</i> , que foram classificadas em $<2 \mu\text{m}$, $2-6 \mu\text{m}$ ou $>6 \mu\text{m}$ de diâmetro. Não houve diferença estatística entre grupos (Mann Whitney).....	40
Figura 14	Efeitos dos diferentes meios MIV (GBSA: 8mg/mL de BSA-FAF, GSFB: 10%SFB e GB+S: 6mg/ml de BSA-FAF + 5% SFB) no acúmulo lipídico embrionário (μm^2 de lipídeo/embrião). Os dados são mostrados pela média da área lipídica/embrião dos diferentes grupos de blastocistos. Não houve diferença estatística entre grupos ($p<0.05$, Mann Whitney).....	43

Figura 15	Efeitos dos diferentes meios de MIV (GBSA: 8mg/mL de BSA-FAF, GSFB: 10%SFB e GB+S: 6mg/ml de BSA-FAF + 5% SFB) sobre o tamanho das gotas lipídicas nos embriões, classificadas em <2 µm, 2-6 µm ou >6 µm de diâmetro. As barras com diferentes letras dentro de cada tamanho diferem entre si (p<0,05, Mann Whitney).....	43
Figura 16	Influência dos suplementos durante a MIV (GBSA: 8mg/mL de BSA-FAF, GSFB: 10%SFB e GB+S: 6mg/ml de BSA-FAF + 5% SFB) na dinâmica dos lipídeos ao longo da PIVE bovinos.....	44
Figura 17	Influência de diferentes suplementos proteicos durante a MIV (GBSA: 8mg/mL de BSA-FAF, GSFB: 10%SFB e GB+S: 6mg/ml de BSA-FAF + 5% SFB) sobre o tamanho de gotas lipídicas ao longo da PIVE em bovinos.....	44
Figura 18	Expressão dos genes <i>DGAT2</i> e <i>PLIN2</i> nas células do <i>cumulus</i> e oócitos desnudos imaturos e maduros nos diferentes grupos de MIV (GBSA: 8mg/mL de BSA-FAF, GSFB: 10%SFB e GB+S: 6mg/ml de BSA-FAF + 5% SFB) e nos subsequentes blastocistos produzidos. Letras diferentes para o mesmo gene mostram diferenças entre si (p<0,05) pelo teste de Duncan.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Quantidade lipídica dos meios de MIV dos diferentes grupos (GBSA, GSFB e GB+S).....	34
Tabela 2.	Perfil lipídico do SFB. Fórmula, nome, quantidade (mg/100mL) e porcentagem (% área) que representam cada ácido graxo detectado na cromatografia de gás.....	35
Tabela 3.	Quantidade de ácidos saturados, monoinsaturados, polinsaturados e lipídeos trans da amostra SFB detectada na cromatografia gasosa.....	36
Tabela 4.	Taxas de oócitos bovinos maduros (em MII, como definido pela maturação nuclear) e com GC dispostos na periferia após 24 horas de maturação <i>in vitro</i> nas diferentes suplementações (G1: 8mg/mL de BSA-FAF, G2: 10%SFB e G3: 6mg/ml de BSA-FAF + 5% SFB).....	36
Tabela 5.	Taxas de oócitos nas diferentes categorias de localização de mitocôndrias (periferia, transição e disperso) e gotas lipídicas (periferia e disperso) tanto em oócito imaturo, como nos maduros <i>in vitro</i> (G1, G2 e G3) e <i>in vivo</i>	38
Tabela 6.	Taxas de oócitos nas diferentes categorias de localização de mitocôndrias (periferia, transição e disperso) e gotas lipídicas (periferia e disperso) nos oócitos maturados <i>in vivo</i> , separando-se maduros (MII) (38/58-65,5%) de imaturos (20-58-34,5%).....	38
Tabela 7.	Taxas de clivagem e de blastocistos após MIV de oócitos em diferentes meios (G1: 8mg/mL de BSA-FAF, G2: 10%SFB e G3: 6mg/mL de BSA-FAF + 5%SFB), fecundação e cultivo <i>in vitro</i> por 8 dias na ausência de SFB.	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	Acetil CoA carboxilase
ADRP	Proteína relacionada com a diferenciação de adipócitos
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Trifostato de adenosina
BSA	Albumina sérica bovina
BSA-FAF	Albumina sérica bovina livre de ácidos graxos
BVB	Diarreia viral bovina
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
COC	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
CPT	Carnitina palmitoil transferase 1
DGAT2	Diacilglicerol aciltransferase 2
EEB	Encefalopatia espongiforme bovina
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
G	Grama
GC	Grânulos corticais
GI	Grau I
GII	Grau II
GIII	Grau III
LH	Hormônio luteinizante
MII	Metáfase II
MAM	Membranas associadas à mitocôndria
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MCI	Massa celular interna
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
Min	Minuto
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
mG	Miligrama
NEFA	Ácidos graxos não esterificados
nM	Nanomolar
O ₂	Oxigênio
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PLIN	Perilipina
PLIN1	Perilipina 1
PLIN2	Perilipina 2
PLIN3	Perilipina 3
PVA	Alcool polivinílico
PVP	Polivinilpirrolidona
RE	Retículo endoplasmático
SB	Solução de bloqueio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
S	Segundos
SOF	Fluido sintético de tuba uterina

SFB	Soro fetal bovino
TCM 199	Tissue culture medium 199
TIP47	“tail interacting protein 47”
TF	Trofectoderma
TG	Triacilglicerois
VG	Vesícula germinativa
ZP	Zona pelúcida
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm ²	Micrometro quadrado
X ²	Qui-quadrado

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SUPLEMENTOS NA MATURAÇÃO OOCITÁRIA SOBRE O ACÚMULO DE LIPÍDEOS CITOPLASMÁTICOS EM OÓCITOS E EMBRIÕES BOVINOS CULTIVADOS *IN VITRO*

RESUMO – O excessivo acúmulo lipídico que acontece ao longo da produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem sido apontado como prejudicial à criopreservação. Como o soro fetal bovino (SFB) é um dos fatores que provoca maior impacto neste acúmulo, e pelo mesmo ser de composição indefinida, procura-se substituí-lo nos meios de cultivo. Entre os possíveis substitutos, está o composto semi-definido, livre de ácidos graxos, a albumina sérica bovina (BSA). O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da BSA e/ou SFB na MIV sobre o acúmulo lipídico nos oócitos e embriões bovinos, e para isso, cinco experimentos foram realizados. No primeiro experimento, demonstrou-se que o meio contendo SFB possui dezoito vezes mais lipídeos que o meio contendo apenas BSA como fonte proteica. No segundo experimento, confirmou-se que, ao contrário da maturação *in vivo*, a maturação *in vitro* (MIV) provoca acúmulo lipídico, sendo este acúmulo mais acentuado no grupo suplementado exclusivamente com SFB, comparado ao grupo suplementado com BSA, sem observar-se diferença nos tamanhos das gotas oocitárias entre os grupos. Oócitos maturados na presença do SFB apresentaram melhores taxas de maturação nuclear e citoplasmática, porém, mostraram diferenças com relação à quantidade e migração de lipídeos e mitocôndrias em comparação àqueles obtidos após maturação *in vivo*. Nos experimentos III e IV, observou-se que, além de não levar a uma esperada diminuição da quantidade de lipídeos nos blastocistos produzidos, a BSA na MIV levou a menores taxas de desenvolvimento embrionário. Sobre o tamanho das gotas embrionárias, constatou-se que a MIV suplementada com SFB provoca maior porcentagem de gotas entre 2 a 6 µm de diâmetro comparada a MIV suplementada por ambas as substâncias. Além do mais, percebeu-se um aumento do tamanho das gotas ao longo da PIVE independente da suplementação durante a MIV. No último experimento, determinou-se a expressão dos genes envolvidos na síntese lipídica, *PLIN2* e *DGAT2*, havendo aumento na expressão do *PLIN2* e diminuição do *DGAT2* nas células do *cumulus* ao longo da MIV. Ademais, nos oócitos expostos a maiores concentrações de SFB, houve diminuição na expressão do *DGAT2*. Observou-se ainda que os tratamentos durante a MIV não influenciaram na expressão dos genes nos blastocistos produzidos. Portanto, conclui-se que a MIV influencia negativamente na quantidade e migração de lipídeos e mitocôndrias. Além disso, a BSA não mostrou ser um bom candidato para a substituição do SFB, pois não levou a taxas satisfatórias de maturação oocitária e desenvolvimento embrionário, e não foi capaz de diminuir o acúmulo lipídico nos blastocistos. Ainda, os genes *PLIN2* e *DGAT2*, indicadores de metabolismo lipídico, estão presentes em oócitos e embriões bovinos, porém, não tiveram a expressão alterada em função da utilização de diferentes fontes proteicas.

Palavras-chaves: Albumina sérica bovina (BSA), lipídeos, maturação *in vitro* (MIV), mitocôndrias, soro fetal bovino (SFB), produção *in vitro* de embriões (PIVE).

INFLUENCE OF DIFFERENT SUPPLEMENTATION DURING OOCYTE MATURATION ON CYTOPLASMIC LIPID ACCUMULATION IN BOVINE OOCYTES AND EMBRYOS CULTURED *IN VITRO*.

ABSTRACT - The excessive lipid accumulation that occurs during *in vitro* production of embryos (IVPE) has been described as harmful to cryopreservation. Because fetal bovine serum (FBS) is one of the factors that cause the greatest impact in this accumulation, and because it is an undefined medium supplement, current research is aimed at replacing this supplement in culture media. Among the possible substitutes, there is a semi defined compound, fatty acid free bovine serum albumin (BSA). The present study aimed to evaluate the influence of BSA and/or FBS during IVM on lipid accumulation in oocytes and embryos, and for that, five experiments were performed. The first experiment demonstrated that the medium containing FBS has eighteen times more lipids than the medium containing only BSA as a protein source. In the second experiment, it was confirmed that, unlike *in vivo* maturation, *in vitro* maturation (IVM) causes a lipid accumulation, which is more pronounced in the group supplemented only with FBS, compared with BSA group, without showing difference in oocytes droplets sizes between groups. Oocytes matured in the presence of FBS showed better rates of nuclear and cytoplasmic maturation, however, they also showed differences relative to the amount and migration of lipids and mitochondrias in comparison to those obtained after *in vivo* maturation. In the experiments III and IV, it was observed that the expected decrease in the amount of lipids produced in blastocysts, supplemented solely with BSA, did not take place, and the use of BSA alone in IVM led to lower rates of embryo development. Furthermore, for embryos lipid droplets sizes, a higher percentage of droplets between 2-6µm was observed in IVM supplemented with FBS compared to supplemented with both substances. The last experiment determined the expression of genes involved in lipid synthesis, DGAT2 and PLIN2. Increased expression of PLIN2 and decreased expression of DGAT2 were observed in cumulus cells following IVM. Moreover, in oocytes exposed to higher concentrations of FBS, there was a decrease in the expression of DGAT2. It was also observed that the different IVM treatments did not affect the expression of these two genes in blastocysts. Therefore, it was concluded that IVM negatively affects the amount and migration of lipids and mitochondrias. Furthermore, BSA was not a good candidate to replace FBS, as it did not lead to satisfactory rates of embryo development and oocyte maturation, and it was not able to decrease lipid accumulation in blastocysts. Also, PLIN2 and DGAT2 genes, indicators of lipid metabolism, are present in oocytes and embryos, and the use of different protein sources did not alter their expression in blastocysts.

Keywords: Bovine serum albumin (BSA), fetal bovine serum (FBS), *in vitro* maturation (IVM), lipids, mitochondrias, *in vitro* production of embryos (IVPE).

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos é uma ferramenta extremamente útil, utilizada para atingir diferentes objetivos. Embora seja uma biotécnica que permite o estudo da biologia reprodutiva, também é ferramenta para outras biotécnicas de grande interesse científico como a clonagem, transgenia ou estudos de células tronco. Ademais, a PIVE permite, entre outras coisas, a comercialização dos embriões produzidos, acelerando o melhoramento genético e a manutenção de bancos de embriões congelados.

Apesar da PIVE ser o foco de inúmeras pesquisas, ainda existem restrições que limitam as taxas de desenvolvimento, sendo que são relatadas dificuldades desde a etapa de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos (LONERGAN *et al.*, 2006). É comum utilizar-se suplementos proteicos nos meios de PIVE, sendo o soro fetal bovino (SFB) o mais utilizado, por proporcionar maiores taxas de embriões. Entretanto, há diversos aspectos negativos presentes na utilização desse composto proteico, pois além de ser um meio indefinido, ter o potencial de transmitir diversos patógenos e alterar a expressão de vários genes, os embriões expostos a esse suplemento apresentam um excessivo acúmulo de gotas lipídicas citoplasmáticas, fato relacionado à diminuição da criotolerância dos mesmos (ABE *et al.*, 1999 e RIZOS *et al.*, 2003).

É por esses motivos que se busca um substituto do SFB, sendo a albumina sérica bovina (BSA) um dos candidatos propostos por vários autores (ALI *et al.*, 2002, RIZOS *et al.*, 2003, RUSSELL *et al.*, 2006 e KORHONEN *et al.*, 2010). A BSA é um composto proteico semi-definido livre de ácidos graxos que parece ser capaz de diminuir o acúmulo lipídico. Porém, há controvérsias quanto às taxas de maturação e desenvolvimento embrionário obtidas com o seu uso (ALI *et al.*, 2002, RUSSELL *et al.*, 2006 e KORHONEN *et al.*, 2010).

Embora a alta quantidade de lipídeos seja um fator limitante para a criopreservação, existe a necessidade da presença dessas estruturas pelo fato das mesmas serem responsáveis pelo fornecimento energético dentro de qualquer célula. Esse aporte energético é imprescindível para o adequado

desenvolvimento embrionário e será dependente dos lipídeos oocitários durante as primeiras clivagens (STURMEY *et al.*, 2009).

A maior parte dos lipídeos presentes nos oócitos e embriões são triacilgliceróis (TG) (FERGUSSON e LEESE, 1999). Os TG são sintetizados pela ação da enzima diacilglicerol aciltransferase 2 (DGAT2) e encontram-se concentrados dentro de gotas lipídicas citoplasmáticas, que por sua vez, ficam rodeadas por proteínas denominadas “*PAT proteins*”. Entre essas, está a perilipina 2 (PLIN2), proteína que foi encontrada nas gotas lipídicas de oócitos murinos (YANG *et al.*, 2010) e bovinos (AADERMA *et al.*, 2011). Ambas as proteínas, tanto a DGAT2 como a PLIN2, associam-se com o acúmulo lipídico, pois além de serem responsáveis pela síntese dos TG e gotas lipídicas, estão relacionadas com a entrada de TG nas gotas e, em consequência, com o tamanho das mesmas (BICKEL *et al.*, 2009 e KUERSCHNER *et al.*, 2008)

A energia para o suporte celular em forma de trifosfato de adenosina (ATP) é gerada a partir da β -oxidação dos ácidos graxos dentro das mitocôndrias (CUMMINS, 2004). Pela estreita relação que apresentam, diversos trabalhos foram realizados para avaliação do comportamento dessas organelas durante a β -oxidação (FERGUSON E LEESE, 1999, STORKOVIC *et al.*, 2001, STURMEY *et al.*, 2009 e DUNNING *et al.*, 2010).

Embora esteja descrita a migração conjunta de mitocôndrias e gotas lipídicas desde a periferia até uma localização mais dispersa dentro do citoplasma oocitário durante a maturação, *in vivo* e *in vitro* (KRIP *et al.*, 1983, HYTTEL *et al.*, 1997 e HYTTEL *et al.*, 1986), ainda existem controvérsias sobre o assunto. Há relato, inclusive, de uma migração de mitocôndrias e lipídeos assíncrona durante a MIV em oócitos equinos (AMBRUOSI *et al.*, 2009), mostrando a necessidade de maior elucidação dos acontecimentos envolvendo essas organelas durante o processo *in vitro*.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo o estudo da influência da suplementação proteica durante a MIV com SFB, BSA ou a combinação de ambas as fontes sobre o acúmulo lipídico nos oócitos e embriões. Para isso, além da análise das taxas de maturação oocitária e de desenvolvimento embrionário e do acúmulo lipídico nos oócitos e embriões, foi estudada a

expressão dos genes DGAT2 e PLIN2 tanto durante a MIV quanto nos embriões produzidos, dando-se nesse trabalho especial ênfase na relação mitocôndria-lipídeo durante a maturação *in vitro* e *in vivo*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1.- Produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos

A possibilidade comercial da transferência de embriões nos anos 80 impulsionou a reprodução assistida em bovinos e o nascimento do primeiro bezerro oriundo da fertilização *in vitro* (FIV) em 1981 (BRACKETT *et al.*, 1982).

A PIVE é uma biotécnica utilizada com o objetivo de aumentar a eficiência reprodutiva dos animais, sem que haja comprometimento da vida produtiva dos mesmos (BOUSQUET *et al.*, 1999). Gonçalves *et al.*, (2007) citaram as numerosas vantagens que essa técnica pode proporcionar, uma vez que permite a diminuição do intervalo entre as gerações, acelera o melhoramento genético animal, amplia a vida reprodutiva de animais de alto valor genético portadores de alterações adquiridas, facilita a comercialização internacional do material genético e permite a formação de bancos de gametas e embriões criopreservados, entre outras.

Além do foco comercial, há um forte interesse científico na PIVE, e diversas pesquisas têm sido voltadas para o estudo da mesma. Essa biotécnica, bem como suas etapas, são ferramentas fundamentais na realização de outras biotecnologias como a clonagem, transgenia, e pesquisas com células tronco. Além disso, é uma excelente ferramenta para o estudo da biologia reprodutiva (GORDON, 2003).

A produção *in vitro* consiste em três etapas fundamentais: a maturação *in vitro* (MIV) e a fecundação *in vitro* (FIV) de oócitos e o cultivo *in vitro* (CIV) de embriões.

Durante a MIV, o oócito sofre diversas mudanças nucleares e citoplasmáticas para tornar-se maturo, apto para a fecundação e competente para suportar o desenvolvimento embrionário (GORDON, 2003)

A FIV é a técnica laboratorial que permite a união entre os gametas feminino (oócito) e masculino (espermatozóide) para a formação do zigoto, sendo que os mesmos são incubados conjuntamente em meio de cultivo propício para a capacitação espermática e fecundação (MACHATY *et al.*, 2012).

Na etapa de CIV ocorrem diversas divisões mitóticas das células zigóticas até que o embrião atinja a fase de mórula. Posteriormente, inicia-se a formação do blastocisto. No blastocisto as células se diferenciam formando a massa celular interna (MCI), que originará o feto, o trofotoderma (TF), que originará os anexos embrionários, e a cavidade chamada blastocelo (GORDON, 2003). O cultivo até o estágio de blastocisto expandido demora de 7 a 8 dias, dependendo do meio utilizado.

2.2. Maturação oocitária

A maturação é o processo no qual o oócito adquire a competência para a fertilização e desenvolvimento embrionário.

Os desenvolvimentos oocitário (oogênese) e folicular (foliculogênese) começam antes do nascimento do animal. O oócito tem o seu processo meiótico estacionado na fase de diplóteno da Prófase I, quando o folículo é ainda primordial, fenômeno conhecido como primeira interrupção meiótica (GORDON, 2003). A retomada do desenvolvimento oocitário somente irá ocorrer na puberdade do animal por estimulação hormonal. Depois do crescimento folicular, o responsável da reativação meiótica, na maioria das espécies, é o pico do hormônio luteinizante (LH), que promove a quebra da vesícula germinativa (VG), retomando assim a divisão meiótica até Metafase II (MII), quando acontece a extrusão do primeiro corpúsculo polar (DEKEL, 2005). Neste momento a maturação oocitária, tanto nuclear como citoplasmática, estaciona-se novamente até o momento da fecundação, consistindo na segunda interrupção meiótica.

Os oócitos maturados *in vivo* são ainda hoje muito superiores em termos de qualidade em comparação aos provenientes de MIV. Embora diversas pesquisas estejam sendo desenvolvidas com o objetivo de aumentar as taxas de PIVE bovinos, apenas 40-50% dos oócitos maturados e fertilizados *in vitro* chegam ao estágio de

blastocisto (RIZOS *et al.*, 2002). Esses valores são significativamente inferiores quando comparados àqueles maturados *in vivo*, no qual cerca de 70% dos oócitos alcançam o estágio de blastocisto mesmo quando a fecundação e o cultivo são feitos *in vitro*, demonstrando que os oócitos maturados *in vitro* são menos competentes no desenvolvimento embrionário que os maturados *in vivo* (LONERGAN *et al.*, 2006).

Dentre os diversos fatores que podem influenciar a diferença entre oócitos maturados *in vivo* e *in vitro* está o fato dos oócitos destinados à MIV serem selecionados a partir de uma população de folículos bastante heterogênea. Além disso, os oócitos são expostos a inadequados níveis de hormônios exógenos e passam por cultivo de 24 horas em um ambiente não fisiológico para seu desenvolvimento (KORHONEN *et al.*, 2010).

A maturação oocitária é dividida entre maturação nuclear e citoplasmática, que ocorrem de maneira simultânea (GORDON, 2003). Porém, outro aspecto a ser considerado na MIV, é o fato de que os oócitos que se encontram em diferentes fases da oogênese após serem retirados do ambiente folicular, iniciam o processo de reativação da meiose (PINGUS *et al.*, 1935). Isso faz com que alguns oócitos alcancem a MII prematuramente, isto é, sem que seja acompanhada pela maturação citoplasmática

Todas as organelas existentes no citoplasma celular sofrem modificações ao longo da maturação oocitária, podendo variar em número e/ou distribuição. O estudo das mesmas tem sido utilizado para determinar a competência oocitária. Dentre elas, as mais avaliadas são os grânulos corticais (GC), as mitocôndrias e os lipídeos.

Os GC são vesículas sintetizadas a partir do aparelho de Golgi, formadas por diversas proteínas, enzimas, glicosaminoglicanos e moléculas que são liberadas durante a fusão dos gametas, para o endurecimento da zona pelúcida (ZP), tendo como função evitar a polispermia (WONG E WESSEL, 2006). Durante a maturação oocitária, os GC aumentam em número e se redistribuem dentro do citoplasma, encontrando-se dispersos e formando “clusters” na fase de VG, enquanto que em MII migram para a periferia do oócito, localizando-se junto à membrana plasmática (DUCIBELLA *et al.*, 1988). No momento da fecundação, quando o espermatozóide entra em contato com o oócito, há um aumento no gradiente de Ca^{+2} no citoplasma

que promove a lise dos GCs, liberando o conteúdo dos mesmos no espaço perivitelino e provocando o endurecimento da ZP, evitando assim a entrada de outros espermatozóides (Revisado por TSAADON *et al.*, 2006).

A mitocôndria é uma organela de origem materna responsável pela produção de energia (ATP) na célula mediante a fosforilação oxidativa (CUMMINS, 2004). Embora recentemente tenha sido relatado um aumento da atividade mitocondrial durante o desenvolvimento embrionário em espécies como a suína (ROMEK *et al.*, 2011) e a bovina (TARAZONA *et al.*, 2006), ainda acredita-se que as mitocôndrias oocitárias sejam as responsáveis pelo fornecimento energético durante o desenvolvimento embrionário, não estando descrita síntese mitocondrial até após o estágio de blastocisto (revisado por VAN BLERKOM, 2011).

Sobre a reorganização mitocondrial, há estudos que relatam que a localização, o número e a atividade mitocondrial interferem na maturação citoplasmática e reativação meiótica oocitária, e consequentemente no desenvolvimento após a fecundação (STOJKOVIC *et al.*, 2001). Van Blerkom (2011) relata que a competência oocitária está diretamente relacionada com a capacidade bioenergética citoplasmática. Ainda, o autor afirma que o desequilíbrio entre fornecimento e demanda de ATP causado pelo insuficiente número de mitocôndrias pode resultar em defeitos no desenvolvimento, tais como: distúrbios na segregação cromossomal, falhas na maturação e fertilização, parada da divisão celular, citocinese anormal e fragmentação.

Durante a mitose, nas divisões zigóticas, as mitocôndrias distribuem-se de forma aleatória, e um déficit de ATP pode ter como consequência a disfunção e fragmentação celular, comprometendo o desenvolvimento do blastocisto (CUMMINS, 2004). No entanto, Ferreira *et al* (2009a) sugerem que alta atividade mitocondrial pode ser prejudicial para o desenvolvimento embrionário. Os autores descrevem a proteção adaptativa do oócito aos metabólitos da oxidação mitocondrial (radicais livres chamados ROS) por moléculas que são geradas no decorrer da maturação oocitária e até o estágio de duas células, tais como peroxidases e glutatona. Essa proteção não existe no embrião, e por isso, se a atividade mitocondrial continua sendo alta durante o desenvolvimento embrionário, e a célula não é capaz de

eliminar a produção excessiva de ROS, a sobrevivência do zigoto poderá ser comprometida (FERREIRA *et al.*, 2009a)

Os mecanismos envolvidos na maturação mitocondrial ainda não foram totalmente elucidados, fazendo com que diversos estudos sejam realizados objetivando-se entender melhor o comportamento dessa organela, por meio de novas técnicas como a técnica de fluorescência ou luminometria, para a avaliação mitocondrial e de ATP, respectivamente (STOJKOVIC *et al.*, 2001 e MACHATKOVA *et al.*, 2011).

Embora ocorra um aumento do ATP gerado durante a MIV de oócitos bovinos (STOJKOVIC *et al.*, 2001), ainda existem controvérsias quanto ao aumento da atividade mitocondrial neste período (TARAZONA *et al.*, 2006 e MACHATKOVA *et al.*, 2011).

As mitocôndrias e as gotas lipídicas estão intimamente relacionadas e são consideradas de grande importância por serem responsáveis pelo suporte energético de qualquer célula, sendo que as técnicas de microscopia de epifluorescência e/ou microscopia confocal têm sido utilizadas para o estudo da migração dessas organelas.

A migração mitocondrial desde a periferia no oócito imaturo até ocupar o citoplasma inteiro de forma dispersa no oócito maturo têm sido relatada em oócitos bovinos (KRIP *et al.*, 1983, HYTTEL *et al.*, 1986, HYTTEL *et al.*, 1997 e ADONA *et al.*, 2008) e suínos (SUN *et al.*, 2001). Mesmo assim, ainda existem muitos dados discrepantes sobre a migração mitocondrial em oócitos bovinos, com relato de alta porcentagem de oócitos imaturos com mitocôndrias dispostas de forma central (MACHATKOVA *et al.*, 2011) e inclusive oócitos maduros mantendo distribuição periférica (TARAZONA *et al.*, 2006), sugerindo que talvez não haja padrão fixo na espécie bovina.

Em relação ao comportamento das gotas lipídicas durante a maturação, há descritas diferenças sobre as migrações e localizações nas diferentes espécies (YANG *et al.*, 2010 e STURMEY *et al.*, 2006). Porém, parece haver um consenso sobre esse comportamento lipídico na espécie bovina, aceitando como padrão lipídico o achado nos estudos de microscopia eletrônica (KRIP *et al.*, 1983, HYTTEL

et al., 1986 e HYTTEL *et al.*, 1997), onde houve migração sincrônica das mitocôndrias e lipídeos desde a periferia até localização dispersa no citoplasma.

Em suínos, Sturmey *et al.* (2006) mostraram que há migração conjunta dessas organelas, porém, em equinos, o padrão descrito por Ambruosi *et al.* (2009) é de que durante a MIV ocorre assincronia na migração das organelas, com gotas lipídicas distribuídas na periferia enquanto as mitocôndrias apresentaram-se de forma heterogênea no citoplasma. Atualmente, poucos são os estudos que relatam a migração conjunta dessas organelas, e por não haver um consenso sobre o que ocorre com estas organelas durante a maturação, pesquisas adicionais são necessárias.

Por outro lado, durante a maturação, ocorrem várias alterações nos oócitos em nível molecular, que compreendem o padrão de transcrição, acúmulo e processamento dos RNAm que se traduzirão em proteínas pelos ribossomos (Revisado por FERREIRA *et al.*, 2009a). O desenvolvimento de blastocistos é dependente dos transcritos derivados do genoma materno, até que ocorra a ativação do genoma embrionário. Dessa forma, os RNAm e proteínas sintetizados durante o crescimento e maturação oocitária contribuirão no desenvolvimento inicial do embrião (WRENZYCKI *et al.*, 2007).

O acúmulo dos RNAm ocorre durante o crescimento oocitário, finalizando na fase de Prófase I. Desse modo, após a quebra da vesícula germinativa, a expressão dos genes estará sob controle pós-transcricional, que envolve degradação, estabilização e acúmulo de transcritos, e seu recrutamento para os processos de tradução (VALEE *et al.*, 2006).

2.3. Suplementação proteica na MIV

A ação das proteínas nas diversas etapas da produção *in vitro*, especialmente na formação dos pronúcleos, tornam a suplementação proteica fundamental ao longo da PIV (ECKERT *et al.*, 1995).

A suplementação do meio MIV com fontes proteicas de origem animal, tais como o SFB, resulta em maiores taxas de maturação e de PIVE (FERGUSON e LEESE 1999, VANROOSE *et al.*, 2001, ALI *et al.*, 2002 e KARHONEN *et al.*, 2010).

O soro possui vários componentes que melhoram o desenvolvimento embrionário, como fatores de crescimento, quelantes de metais pesados e componentes que ajudam na expansão das células do *cumulus* mesmo na ausência do FSH (ABE e HOSHI, 2003). Além disso, diversos estudos apontam que o soro tem um comportamento bifásico, inibindo inicialmente as primeiras clivagens, e estimulando posteriormente o desenvolvimento de mórulas e blastocistos (GORDON, 2003).

Embora o soro apresente melhores taxas de PIVE, ainda tem demonstrado alguns inconvenientes. O primeiro obstáculo refere-se à barreira sanitária. O soro é um derivado sanguíneo indefinido, o que limita a comercialização desses embriões pelo alto risco de contaminação por patógenos (KRISHER e BAVISTER, 1999), tanto virais como príons, aumentando o risco de doenças, como por exemplo, a encefalopatia espongiforme bovina (EEB) e a diarréia viral bovina (BVD) (ABE *et al.*, 1999 e RATY *et al.*, 2011).

A utilização do soro pode ocasionar, além de alterações na ultraestrutura, na compactação e blastulação embrionária e na expressão de RNAm, aumento na incidência de natimortos e mortalidade após o nascimento (ABE *et al.*, 1999).

Ademais, a suplementação do meio com SFB parece resultar em acúmulo lipídico. Aparentemente, o soro altera o metabolismo embrionário nas primeiras etapas do desenvolvimento, aumentando a concentração de ácidos graxos e gotas lipídicas citoplasmáticas nos blastocistos (FERGUSON e LEESE, 1999), que consequentemente, diminui a criotolerância embrionária (RIZOS *et al.*, 2003).

Sabe-se que a presença do SFB no CIV aumenta o acúmulo lipídico, e pode prejudicar a criopreservação desses embriões (RIZOS *et al.*, 2003, GOMEZ *et al.*, 2008 e BARCELÓ-FIMBRES *et al.*, 2011). No entanto, ainda existe controvérsia sobre o que ocorre quando o SFB é adicionado durante a MIV. Parece existir um aumento lipídico nos oócitos bovinos maturados com SFB, quando comparado com os maturados em presença de BSA (FERGUSON e LEESE, 1999 e KIM *et al.*, 2001), e existem estudos que mostram persistência dessa diferença nos embriões produzidos (FERGUSON e LEESE, 1999 e ABE *et al.*, 2002). Também há relatos que mostram que os embriões produzidos na presença de soro durante a MIV apresentam maior número de gotas grandes (2-6 μm) e gigantes (>6 μm) quando comparados àqueles produzidos sob efeito do BSA (ABE *et al.*, 2002).

Por todos esses motivos, atualmente tem se buscado substituto para o SFB que proporcione taxas satisfatórias na PIVE, produzindo embriões de alta qualidade. Para isso, vários compostos têm sido propostos, entre eles a BSA, o polivinilpirrolidona (PVP) e o álcoolpolivinílico (PVA).

Embora o PVA seja um composto definido, quando utilizado de forma isolada não proporcionou taxas de PIVE satisfatórias (ALI *et al.*, 2002). O efeito do PVP parece ser dependente da concentração utilizada, sendo que em concentrações maiores atua retardando a maturação nuclear e diminuindo as taxas embrionárias (ALI *et al.*, 2002). Ademais, o PVP pode causar alteração no padrão genético embrionário e aumentar os índices de apoptose nos blastocistos cultivados em presença do mesmo, o que pode comprometer a qualidade embrionária (WARZYRCH *et al.*, 2007).

A BSA livre de ácidos graxos (BSA-FAF) tem sido o composto melhor estudado para a substituição do SFB na PIVE, incluindo a MIV, por ser um meio semi definido, proteico e livre de ácidos graxos. Embora Ali *et al.* (2002) relatem que o BSA retarda a maturação nuclear, diminui a expansão das células do *cumulus* e não alcance as taxas de mórulas e blastocistos obtidas com o SFB, também há estudo no qual não foram observadas diferenças nas taxas de maturação nuclear e de blastocistos (RUSSELL *et al.*, 2006). Os resultados obtidos com a adição BSA na MIV são bastante contraditórios, reforçando a necessidade de estudos a respeito da ação deste composto na PIVE.

2.4. Metabolismo das gotas lipídicas citoplasmáticas

A gota lipídica é composta, como ilustrado na Figura 1, por um núcleo hidrofóbico de lipídeos neutros, tais como triacilgliceróis e ésteres, rodeados por uma parte anfipática formada por uma monocamada de fosfolipídeos, colesterol e proteínas (BROWN, 2001 e MARTIN *et al.*, 2006).

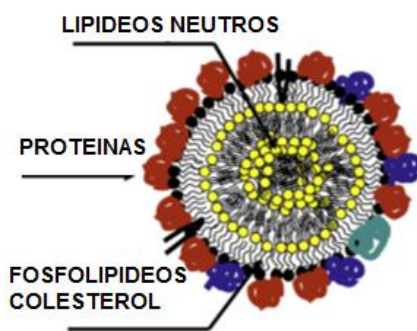


Figura 1. Morfologia da gota lipídica: núcleo composto por lipídeos neutros, envolvidos por uma monocamada de fosfolipídeos, colesterol e proteínas (OLOFSSON *et al.*, 2009)

Os triacilgliceróis (TG) são os lipídeos mais abundantes no oócito e embrião (FERGUSON e LEESE 1999), e por isso são os componentes majoritários do núcleo da gota lipídica citoplasmática nestas células. Os TG são formados na membrana microsomal do retículo endoplasmático (RE) de qualquer célula (MARCHESAN *et al.*, 2003) e são compostos por um glicerol que tem esterificados seus três grupos hidroxilas por três ácidos graxos, saturados ou insaturados. Existem dois precursores do glicerol 3-fosfato, os acil-CoA graxos formados a partir de ácidos graxos, e a diidroxiacetona fosfato que aparece durante a glicólise (LEHNINGER, 2002).

A biossíntese dos triacilgliceróis é composta por três grandes reações: primeiro ocorre a acilação dos dois grupos hidroxila livres do 1-glicerol 3-fosfatase por dois acil-CoA que darão origem ao diacilglicerol 3-fosfatase, também denominado ácido fosfatídico, que em continuação será hidrolisado e convertido em 1,2-diacilglicerol, e por último sofrerá uma transesterificação com um terceiro ácido graxo convertendo o ácido fosfatídico, ao fim, em triacilglicerol (LEHNINGER, 2002). A enzima responsável por essa última reação, e portanto, a mais importante na formação desses lipídeos, é a diacilglicerol aciltransferase2 (DGAT2) localizada no RE e nas gotas lipídicas, enzima que também está relacionada com a entrada de triacilgliceróis nas gotas já formadas (KUERSCHNER *et al.*, 2009)

Como revisado por Walther e Farese (2009), existem três teorias que explicariam a biossíntese das gotas lipídicas (Figura 2); a primeira e mais aceita é aquela na qual os lipídeos neutros (TG e ésteres) são sintetizados entre as duas

camadas da membrana retículo-endoplasmática, aumentando gradualmente em forma globular, e exteriorizando-se rodeados pela membrana exterior do RE já como uma gota lipídica independente. Um modelo alternativo (modelo 2) é aquele no qual a gota é formada por ambas camadas da membrana RE. No último modelo sobre a biossíntese (modelo 3), a gota é formada dentro de pequenas vesículas da bicamada que mantêm-se presa ao RE por uma janela pela qual os lipídeos serão transportados do RE à gota lipídica até completar a formação da mesma.

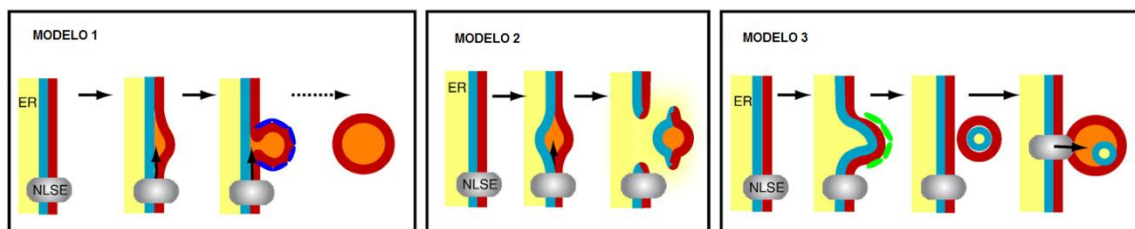


Figura 2. Teorias sobre a biossíntese das gotas lipídicas. Enquanto no modelo 1 os lipídeos são sintetizados entre as duas membranas do RE e depois a gota é liberada rodeada pela membrana exterior, no modelo 2 a gota é composta pelas duas membranas do RE. Na última teoria, modelo 3, as gotas são formadas dentro de pequenas vesículas de bicamada que mantêm-se presas ao RE por uma janela pela qual os lipídeos serão transportados (WATHER E FARESE, 2009).

Em recentes estudos sobre o proteoma das gotas lipídicas nas células dos mamíferos foram identificadas um total de 125 proteínas (BARTZ *et al.*, 2007). As mais conhecidas proteínas relacionadas com as gotas são as denominadas proteínas PAT (“PAT proteins”). Existem diversas proteínas pertencentes a esta família, no entanto, as mais importantes e melhor estudadas nos mamíferos são três: perilipina (PLIN), adipofilina ou proteína relacionada com a diferenciação de adipócitos (ADRP) e “tail interacting protein” (TIP 47) (BICKEL *et al.*, 2009), atualmente denominadas perilipina 1 (PLIN1), perilipina 2 (PLIN 2) e perilipina 3 (PLIN 3), respectivamente (KIMMEL *et al.*, 2012).

Além das diferentes formas de ação, as proteínas diferenciam-se pelos tipos celulares que se apresentam. A PLIN1 é uma proteína com restrição de tecido e encontra-se unicamente em adipócitos e células esteroideogênicas (LONDOS *et al.*, 1995), enquanto a PLIN2 (antiga ADRP) é expressa em qualquer tecido, encontrando-se altamente concentrada na membrana do RE onde irá formar a gota

(Revisado por OLOFSSON *et al.*, 2009). Assim como a PLIN2, a TIP 47 ou PLIN3 pode ser encontrada em qualquer tecido, mas unicamente quando os níveis de ácidos graxos na célula estão muito aumentados (WOLINS *et al.*, 2001).

Embora essas proteínas PAT sejam estudadas há anos em diferentes tipos celulares, apenas em 2010 a PLIN2 foi identificada em gotas lipídicas de oócitos (COCs) de camundongos (YANG *et al.*, 2010) e em 2011 no oócito de bovino (AARDEMA *et al.*, 2011). A revisão feita por Bickel *et al.* (2009) descreve a PLIN 2 como responsável por limitar a interação entre as lipases e os lipídeos neutros das gotas, promovendo assim o acúmulo desses lipídeos, e de aumentar o número e tamanho das gotas na célula, permitindo a incorporação de lipídeos nas gotas.

Acredita-se que a proteína PLIN2 tenha sido detectada unicamente em oócitos de camundongos e bovinos, sem haver relatos em embriões de nenhuma espécie. Ademais, de acordo com nosso conhecimento, a DGAT2 ainda não foi descrita em oócitos e embriões. Pela relação que essas proteínas mantêm com o acúmulo lipídico, o estudo das mesmas é de extrema importância para a PIVE.

Uma vez formada, a gota lipídica pode ter um diâmetro que varia de 0,1 μm nas células dos fungos, até 200 μm nos adipócitos (WALTHER E FARESE 2009). As gotas são organelas dinâmicas que podem aumentar de tamanho transportando lipídeos neutros até o interior da gota ou fusionando-se umas com as outras, ou ter diferentes interações com outras organelas celulares. A fusão entre duas gotas lipídicas é independente da biossíntese de TG e é sabido que 15% das gotas de qualquer célula sofrem esse processo num determinado momento (OLOFSSON *et al.*, 2009). Existem várias moléculas envolvidas neste processo de fusão, que são as chamadas proteínas SNAREs, receptores que se encontram nas gotas e que permitem a fusão entre duas, promovendo a união das duas monocamadas das gotas, e permitindo assim, a conexão entre as duas fases hidrofóbicas (BOSTROM *et al.*, 2007).

As gotas lipídicas, as mitocôndrias e o retículo endoplasmático parecem formar uma tríade de trabalho no momento do fornecimento de energia para a célula. No RE existem compartimentos especiais chamados membranas associadas à mitocôndria (MAM) que junto às mitocôndrias, poderiam providenciar energia e NADPH para facilitar a síntese de TG e gotas lipídicas (WALTHER E FARESE,

2009), pois é nas MAMs do RE que se pode encontrar a DGAT2, e é onde as gotas irão se formar dentro do RE (BELLER *et al.*, 2010).

Quando ocorre demanda de energia na célula, ácidos graxos são metabolizados na mitocôndria via β -oxidação para obtenção de ATP (Figura 3). Esses ácidos graxos podem ser provenientes da quebra da gota lipídica por lipases ou de biossíntese celular. De acordo com Downs et al (2009) o acetil-CoA é convertido em manoil-CoA pela enzima acetil-CoA carboxilase (ACC) que, por sua vez, será convertido em ácido graxo pelas enzima ácido graxo sintetase (FAC). Como relata o autor, em caso de requerimento energético, o ácido graxo é metabolizado a acil-CoA graxo, que será transportado até o interior da mitocôndria mediante carnitina e o receptor celular chamado carnitina palmitoil tranferase 1 (CPT1). Ademais, existe uma regulação interna dessa via, pois quando há demanda de lipídeos, o manoil-CoA inibe a CPT1 para que não ocorra a β -oxidação dos ácidos graxos (RUDERMAN *et al.*, 2003).

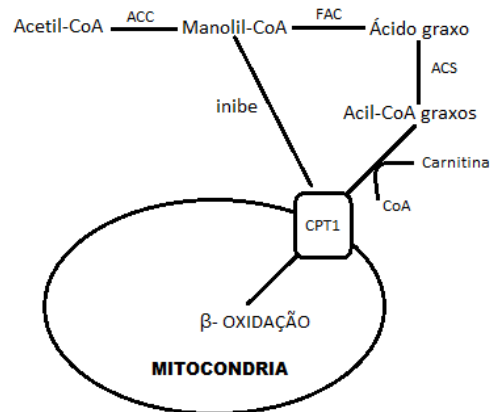


Figura 3. Esquema dos principais acontecimentos durante a β -oxidação. Ácidos graxos são convertidos em acil-CoA graxos, que por sua vez, serão transportados pela carnitina e o receptor de membrana CPT1 até o interior da mitocôndria, onde acontecerá a β -oxidação. Quando há necessidade de lipogênese, o manoil-CoA, precursor da síntese dos ácidos graxos, inibe o CPT1, impedindo a entrada dos ácidos na mitocôndria e sua oxidação.

2.5. Função e comportamento das gotas lipídicas no oócito e embrião

Os lipídeos são essenciais para qualquer célula, pois estes fornecem a energia necessária para o metabolismo celular. Porém, durante a β -oxidação dos lipídeos liberam-se espécies reativas de oxigênio (ROS), que numa alta concentração podem lesionar as mitocôndrias, comprometendo seu funcionamento (DUVNJAK *et al.*, 2007).

Ademais, o acúmulo excessivo de gotas lipídicas no embrião é prejudicial à criotolerância, pois os ácidos graxos livres liberados da lipólise das gotas podem entrar na membrana plasmática, mudando a composição da mesma, provocando o endurecimento da membrana, e resultando em embriões menos resistentes às técnicas de criopreservação (Revisado por GOMEZ *et al.*, 2008).

A relação negativa existente entre o excesso de lipídeos na PIV e a criotolerância embrionária, junto aos problemas causados por uma alta concentração de ROS, são os motivos pelos quais tem se estudado o acúmulo lipídico nos oócitos e embriões PIV. Por isso, vem sendo realizadas pesquisas tanto a respeito da função fisiológica dos lipídeos, quanto sobre os inconvenientes provocados pelo acúmulo massivo dessas gotas lipídicas citoplasmáticas.

Os oócitos das espécies suína, bovina e ovina acumulam um alto conteúdo lipídico no citoplasma (MCKEEGAN E STURMEY, 2012). Esses lipídeos endógenos são suficientes para suportar o requerimento metabólico durante a maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário (STURMEY *et al.*, 2009), mas ainda hoje desconhece-se o período exato em que os lipídeos acumulam-se no oócito. Durante a progressão desde folículo primordial até o oócito maturo em Metáfase II há vários períodos em que o oócito pode acumular lipídeos, e parece que na MIV são as últimas etapas da maturação as mais susceptíveis a esse acúmulo (MCKEEGAN E STURMEY, 2012).

O acúmulo de triacilgliceróis nos oócitos e embriões bovinos foi estudado primeiramente por Ferguson e Leese (1999). Esses autores observaram uma diminuição dos TG durante a MIV, aumentando o acúmulo depois da formação do zigoto até a fase embrionária de oito células, e apresentando um acúmulo ainda maior na fase de expansão e eclosão embrionária. Essa diminuição lipídica durante

a MIV foi descrita também por outros autores (KIM *et al.*, 2001 e ROMEK *et al.*, 2010). Em contrapartida, há estudos relatando um acúmulo lipídico nessa etapa (YANG *et al.*, 2010 e FERREIRA *et al.*, 2009b), fazendo da MIV um tópico de grande interesse no estudo do acúmulo lipídico embrionário.

A espectrometria de massa é uma das técnicas mais inovadoras para o estudo do lipidoma. Ferreira *et al.* (2010) utilizaram a técnica para a quantificação de lipídeos nos oócitos e embriões, e observaram que a quantidade de TG no oócito aumenta na maturação, detectando nos mesmos, ácidos como o ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C:18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3).

Consta que alguns ácidos graxos, como os ácidos graxos não esterificados (NEFA) têm a capacidade de acúmulo durante a maturação nuclear oocitária (Aardema *et al.*, 2011). Shehab-El-Deen *et al.* (2009) observaram que a adição na MIV de NEFAs, como o ácido palmítico e esteárico, podem prejudicar a criopreservação dos blastocistos produzidos. Trabalhos mais recentes relatam os possíveis efeitos benéficos que outros ácidos graxos podem proporcionar na MIV, como o ácido linolênico, que ajuda na progressão meiótica aumentando a atividade da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Marei *et al.*, 2010). Os ácidos araquidônico (C:20:4) e eicosapentaenoico (C:20:5) (MARQUES *et al.*, 2007) ou o ácido linoleico conjugado trans-10 cis-12 (CLA) (LAPA *et al.*, 2011), quando adicionados ao meio de maturação, também promovem efeitos benéficos sobre a qualidade embrionária e criopreservação.

Assim, há necessidade em se esclarecer o comportamento lipídico na maturação oocitária, para que se possa, posteriormente, compreender o acúmulo lipídico embrionário.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a influência da suplementação com SFB, BSA livre de ácidos graxos (BSA-FAF) ou a combinação de ambos durante a MIV no acúmulo lipídico oocitário e embrionário.

3.2. Objetivos específicos

- Quantificar o teor lipídico do SFB e calcular a quantidade de lipídeos que cada suplementação adiciona no meio de MIV.
- Avaliar a maturação nuclear e a migração de grânulos corticais dos oócitos maturados *in vitro* nas diferentes suplementações proteicas.
- Caracterizar o padrão de migração de mitocôndrias e gotas lipídicas, além da quantificação dessas organelas nos oócitos maturados *in vitro* e *in vivo*.
- Avaliar o efeito das suplementações proteicas sobre as taxas de desenvolvimento embrionário.
- Quantificar o acúmulo lipídico nos embriões produzidos subsequentes à MIV em SFB, BSA-FAF ou combinação de ambos.
- Avaliar a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico (*PLIN2* e *DGAT2*) em células do *cumulus*, oócitos desnudos imaturos e maduros, e nos embriões produzidos por cada suplementação.

4. HIPÓTESES

- A MIV permite adequada migração e correlação entre gotas lipídicas e mitocôndrias, porém, leva a um maior acúmulo de lipídeos nos oócitos em comparação à maturação *in vivo*.
- A MIV suplementada com BSA-FAF permite a diminuição do acúmulo lipídico oocitário e embrionário na PIVE comparado à MIV com SFB
- Os genes *PLIN2* e *DGAT2* estão expressos em oócitos e embriões da PIV, tendo correlação positiva entre a quantidade de lipídeos e expressão dos genes.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local do experimento

Os experimentos foram realizados durante os anos 2011-2012 no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista - UNESP, em Jaboticabal, São Paulo, se o contrario não for indicado.

5.2. Produtos

Produtos químicos e meios foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), a menos que indicado de outra forma.

5.3. Delineamento experimental

Considerando que o suplemento BSA-FAF (A8806) é praticamente isento de ácidos graxos e o SFB é um suplemento com alto conteúdo lipídico, foram

delineados três grupos experimentais, sendo um grupo praticamente livre de lipídeos durante a MIV, contendo 8mg/mL BSA-FAF (GBSA); um grupo com alto conteúdo lipídico, ou seja, 10% de SFB (GSFB); e um grupo composto por ambos os suplementos, porém, em proporções menores: 6mg/mL de BSA-FAF + 5% SFB, GB+S.

No Experimento I, foi determinada a quantidade lipídica nos meios de MIV dependendo do suplemento proteico (SFB, BSA-FAF ou a combinação de ambas) mediante a cromatografia de gás do SFB, e tendo em consideração a informação que o fabricante proporciona sobre o aporte lipídico do BSA-FAF.

No Experimento II, avaliamos a influência dos diferentes suplementos dos meios MIV sobre a maturação nuclear e citoplasmática, com ênfase no comportamento lipídico-mitocondrial durante a MIV, sendo comparado com os acontecimentos na maturação *in vivo*.

Os Experimentos III e IV foram realizados para o estudo das taxas de desenvolvimento e acúmulo lipídico nos blastocistos provenientes dos diferentes meios de maturação.

Por último, no Experimento V, determinamos a expressão de genes envolvidos na síntese de triglicéridos e gotas lipídicas (*DGAT2* e *PLIN2*) nas células do *cumulus* e oócitos imaturos e maduros *in vitro*, e nos subsequentes blastocistos.

5.4. Experimento I: Quantificação e análise do perfil lipídico do SFB e cálculo do teor lipídico dos meios de MIV

5.4.1. Cromatografia gasosa do SFB.

Para a quantificação lipídica e perfil de ácidos graxos do SFB (Nº lote 20540, Cat Nº: FB0010Sr, Cripion, Indústria Brasileira, Andradina, SP, Brasil) foi realizada a técnica de cromatografia gasosa no Laboratório de Lipídeos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. O resultado do teor lipídico e as porcentagens dos

ácidos graxos encontrados foram determinados pela média de cinco repetições de 5mL de SFB.

A extração dos lipídeos e derivatização foram realizadas pelo método descrito pela *Association of Official Analytical Chemists* (2000) com algumas modificações. Desse modo, primeiramente a gordura foi extraída por métodos hidrolíticos (hidrólise ácida), adicionando-se ácido pirogálico para minimizar a degradação oxidativa dos ácidos graxos durante a análise. A extração da gordura foi feita em éter e, posteriormente metilada para ésteres metílicos de ácidos graxos usando trifloreto de boro (BF₃), sendo esses os ácidos detectados pelo cromatógrafo.

A amostra processada foi injetada no cromatógrafo a gás GC 17 A Schimadzu/Class GC 10, e a coluna cromatográfica utilizada foi de sílica fundida SP-2560 (biscianopropil polisiloxana) de 100m e 0,25mm de d.i.

A programação da coluna foi de 140°C por 5 minutos e aquecimento a 4°C/min até 240°C, permanecendo nesta temperatura por 30 minutos. As temperaturas do vaporizador e detector foram de 250°C e 260°C respectivamente e o gás de arraste utilizado foi o hélio (1mL/min).

A amostra injetada no cromatógrafo foi vaporizada e conduzida pela coluna de gás hélio gerando íons. O cromatógrafo separou os diferentes ácidos graxos num gráfico, onde cada um formou um pico com uma área determinada, dependendo de diversos fatores como o ponto de ebulição, interação com a fase estacionária da coluna e quantidade de íons que segrega cada ácido.

Os resultados sobre o perfil de ácidos graxos da amostra foram mostrados em mg/100mL e em % de área, e a determinação de gordura total foi realizada através de cálculos a partir do triglicerídeo de ácido tridecanóico (padrão interno), e mostrado em g/ 100 mL.

5.4.2. Determinação do teor lipídico dos meios de MIV

Após determinação da quantidade de lipídeos (g/ 100 mL) do SFB, e levando-se em consideração a indicação do fabricante sobre o conteúdo lipídico da BSA-FAF (A8806) (no máximo 0,02% de ácidos graxos), foi determinada a quantidade de lipídeos nos diferentes meios de MIV:

- No GBSA, contendo 8mg de BSA- FAF por mL de meio de MIV:

$$\text{mg de lipídeo / mL de meio de MIV} = (0,02 \text{ mg} \times 8 \text{ mg}) / 100 \text{ mg} = 0,0016 \text{ mg de lipídeo / mL}$$
- No GSFB, contendo 10% de SFB , ou seja, 100 µL de SFB por mL de meio de MIV:

$$\text{mg de lipídeo/mL de meio de MIV} = \text{quantidade lipídica do SFB determinada na cromatografia (mg/mL)} \times 0,1 \text{ mL}$$
- No GB+S, contendo 5% de SFB e 6mg/mL de BSA, ou seja, 50 µL de SFB e 6mg de BSA por mL de meio de MIV:

$$\text{mg de lipídeo/mL de meio de MIV} = [\text{quantidade lipídica do SFB determinado na cromatografia (mg/mL)} \times 0,05 \text{ mL}] + [(0,02 \text{ mg} \times 6 \text{ mg}) / 100]$$

5.5. Experimento II. Efeitos da suplementação com SFB, BSA e sua combinação durante a MIV sobre a maturação oocitária.

5.5.1. Obtenção dos ovários.

Os ovários foram obtidos no frigorífico Barra Mansa, localizado no município de Sertãozinho, SP, sendo acondicionados em garrafas térmicas, e imediatamente transportados ao laboratório a temperatura entre 33 e 36 °C.

5.5.2. Obtenção e seleção dos complexos de células do *cumulus* e oócitos (COCs).

No laboratório, os ovários foram lavados com solução salina (a 36°C), e folículos entre 3 e 8mm foram aspirados com o auxílio de agulhas (30x10mm) acopladas à seringas de 20mL. O líquido folicular recuperado foi depositado em tubos cônicos de 50mL. Após 15 minutos, o sedimento foi avaliado, procedendo-se à seleção dos COCs. Os oócitos selecionados foram lavados em meio TCM199 (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 20mM de tampão Hepes, 83,4 µg/mL de amicacina (Instituto Biochimico, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e 0,2mM de

piruvato de sódio e classificados em Grau I (GI), Grau II (GII), Grau III (GIII), desnudos e atrésicos, pelo número de camadas de células de *cumulus* e homogeneidade do citoplasma (Leibfried-LRutledge *et al.*, 1987).

5.5.3. Maturação *in vitro* dos oócitos.

Os COCs de GI e GII foram distribuídos aleatoriamente nos diferentes grupos de MIV em meio base TCM199 contendo 25mM de bicarbonato de sódio, 1,0µg/mL de FSH (Folltropin®, Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canadá), 50µg/mL de hCG (Vetercor®, Intervet, São Paulo, SP, Brasil), 1,0µg/mL de estradiol, 0,20mM de piruvato de sódio, e 83,4µg/mL de amicacina. Esses meios foram suplementados no grupo BSA (GBSA) com 8mg/mL de BSA-FAF, no grupo SFB (GSFB) com 10% de SFB e no grupo BSA + SFB (GB+S) com 6mg/mL de BSA-FAF + 5% de SFB. De 20 a 25 COCs foram transferidos para cada gota de 100 µL do meio MIV correspondente cobertas com óleo mineral estéril (Dow Corning Co., Midland, MI, EUA). Por último, as placas de maturação com os diferentes tratamentos foram devidamente identificadas e mantidas em incubadora a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar e umidade alta por 24 horas.

5.5.4. Avaliação da maturação nuclear e da distribuição de grânulos corticais (GC) como indício de maturação citoplasmática

A maturação nuclear foi avaliada pela progressão meiótica até metáfase II (MII) com a extrusão do primeiro corpúsculo polar, e a citoplasmática inferida pela migração dos GC até a região cortical oocitária. Para isso, foi utilizada a metodologia descrita por Cherr *et al.* (1998) e Avelino (2004) com modificações.

Primeiramente foram removidas as células do *cumulus* dos COCs com diversas pipetagens em 0,2% de hialuronidase (Hyalozima®, Aspen) em PBS. Os oócitos destinados à avaliação da maturação nuclear foram fixados em paraformaldeído (4% em PBS), e aqueles destinados à avaliação citoplasmática foram fixados em formaldeído (3% em PBS) após a remoção da zona pelúcida (ZP) com pronase 0,5% em PBS. Em seguida, todos os oócitos foram incubados por 12

horas, a 4°C, em solução de bloqueio (SB) [PBS com 1mg/mL de albumina sérica bovina, 100mM de glicina (PlusOne, GE Healthcare, New Jersey, USA) e 0,2% de azida de sódio].

Os oócitos livres de ZP foram corados para a avaliação dos GC, sendo permeabilizados em uma SB acrescida com 0,1% de Triton X-100 (USB 22686) por 5 min a 38°C, incubados em 10µg/mL de *Lens culinaris* aglutinina conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC-LCA) por 15 min, e lavados de duas a três vezes em SB. Os oócitos para a avaliação da progressão meiótica foram corados em 10µg/mL de Hoechst 33342 em SB por 10 minutos e posteriormente lavados em SB repetidamente.

Depois de corados, os oócitos foram colocados, separadamente, entre lâmina e lamínula em gota de glicerol. Para a visualização das estruturas, foi utilizado microscópio de epifluorescência (Olympus – IX-FLA-70, Tóquio, Japão), e os oócitos foram avaliados quanto ao estágio nuclear (excitação 330-385nm e emissão 420-490nm) e quanto à distribuição dos GC (excitação 460-490nm e emissão 515nm) (Figura 4). Oócitos em MII e com presença do primeiro corpúsculo polar foram considerados maduros (A) em relação à avaliação do núcleo, enquanto os que se encontravam em outros estádios foram considerados imaturos (B) (Figura 4). Na avaliação da maturação citoplasmática, oócitos com os grânulos corticais dispostos na periferia formando um halo, foram considerados maduros (C), e oócitos com presença de “clusters” (D) ou em transição (E), imaturos.

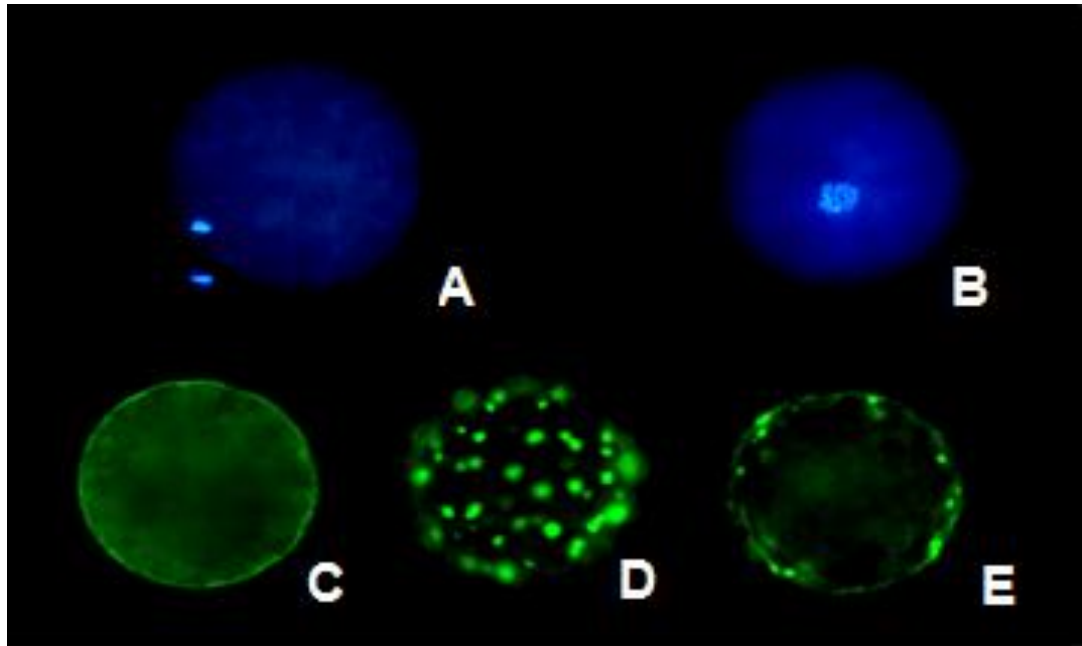


Figura 4. Fotomicrografia da progressão nuclear e distribuição dos grânulos corticais em oócitos bovinos. Quanto à avaliação da progressão nuclear, oócitos em MII e com presença do primeiro corpúsculo polar foram considerados maduros (A), enquanto os que se encontravam em outros estádios foram considerados imaturos (B). De acordo com a migração dos grânulos corticais, oócitos com os grânulos corticais na periferia formando um halo (C) foram considerados maduros, e oócitos com presença de “clusters” (D) ou em transição (E), imaturos.

5.5.5. Avaliação da quantidade e distribuição das mitocôndrias e gotas lipídicas em oócitos imaturos e submetidos à MIV

A avaliação lipídica e mitocondrial foi realizada no Laboratório Multiusuário do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), USP.

Oócitos imaturos e oócitos maturados *in vitro* nos diversos meios foram submetidos às colorações, sendo que cada estrutura foi corada para as duas organelas. No caso das mitocôndrias, foi utilizada a fluorescência de MitoTracker® Red CMXRos (Molecular Probes®, Invitrogen, Eugene, OR, EUA), que tem a capacidade de corar as mitocôndrias ativas em células vivas. Os oócitos foram desnudados mediante pipetagens em 0,2% de hialuronidase em PBS e diretamente corados em 0,5µM de MitoTracker 30 min a 37°C no escuro. Em continuação, os

oócitos foram lavados em PBS repetidas vezes e fixados em formaldeído (4% em PBS), por mais 30 minutos.

Uma vez fixados os oócitos, foram coradas as gotas lipídicas citoplasmáticas com HCS LipidTOX™ Green Neutral Lipid Stain (Molecular Probes® Invitrogen, Eugene, OR, EUA). Primeiramente, os oócitos foram permeabilizados em saponina (0,1% em PBS Ca^{+2} Mg^{+2} free) por 30 minutos, e em seguida corados na solução de trabalho do Lipidtox (3 μL da solução estoque 1000X em 597 μL de PBS livre de Ca^{+2} Mg^{+2}) por uma hora, a temperatura ambiente e no escuro.

Na montagem das lâminas, foi necessária a colagem das estruturas na lamínula mediante polilisina, pelo fato da microscopia confocal ser uma microscopia invertida. Por último, foi adicionada uma gota de glicerol e colocada a lâmina. Para manter a estrutura esférica dos oócitos foi colocado silicone entre lâmina e lamínula.

Para a avaliação e captura de imagens dos oócitos foi utilizado o microscópio confocal TCS-SP5 AOBS (Leica, Soims, Alemanha).

Para a análise, foi avaliada a distribuição das organelas de aproximadamente 60 oócitos por grupo, e capturadas imagens para intensidade de fluorescência mitocondrial e quantificação das gotas lipídicas de 35-40 oócitos por grupo, obtidos em cinco rotinas de MIV.

Sobre a distribuição das organelas, em cada oócito foi avaliada conjuntamente a distribuição mitocondrial e de gotas lipídicas (Figura 5). Desse modo, a distribuição mitocondrial foi classificada em três categorias: Periferia (A) quando as mitocôndrias encontravam-se dispostas em toda a periferia do citoplasma, transição (B) quando mesmo aparecendo na maior parte do citoplasma ainda acumulavam-se numa pequena parte da periferia, e disperso (C), quando as mitocôndrias encontravam-se dispersas em todo o citoplasma. Na avaliação das gotas lipídicas, no entanto, as mesmas foram classificadas somente entre periferia (D) e disperso (E).

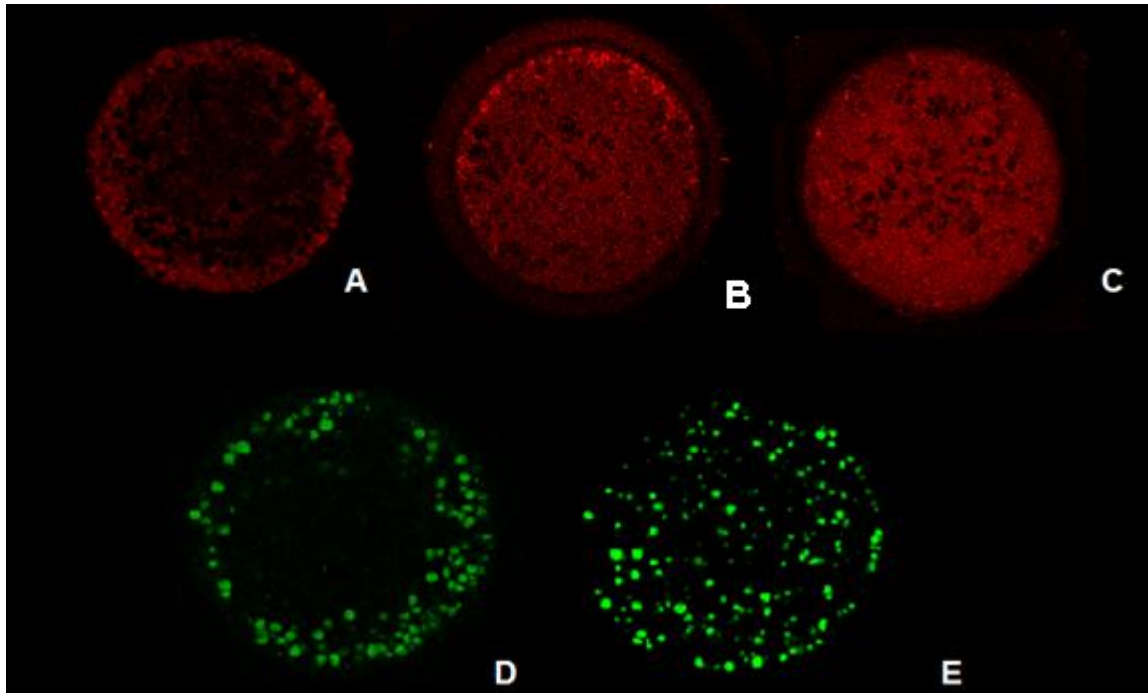


Figura 5. Fotomicrografia ilustrando diferentes categorias da distribuição mitocondrial e de gotas lipídicas nos oócitos. Quanto às mitocôndrias, quando as mesmas se encontravam dispostas em toda a periferia do citoplasma denominou-se periferia (A), transição (B) quando mesmo aparecendo na maior parte do citoplasma ainda acumulavam-se numa pequena parte da periferia, e disperso (C), quando as mitocôndrias localizavam-se dispersas homogeneamente em todo o citoplasma. Quanto às distribuições das gotas lipídicas, as mesmas foram classificadas entre periferia (D) e disperso (E).

Todas as imagens foram capturadas nas mesmas condições microscópicas e foram utilizadas diferentes tipos de lasers. O laser argon 488 foi o escolhido para a visualização das gotas lipídicas, ajustando a excitação/emissão máxima para 495/505, e o laser HeNe 543 foi utilizado para a visualização das mitocôndrias, sendo ajustado para excitação/emissão máxima de 579-599.

Foram escolhidos oócitos de alturas similares (entre 55 e 65 μ m), e a captura das imagens foi feita em objetiva de 40x, realizando-se cinco cortes proporcionais, sendo que o primeiro e último corte foram relativos ao início e final do oócito, respectivamente.

Para a análise da intensidade de fluorescência mitocondrial e quantificação das gotas lipídicas, foram descartados o primeiro e último cortes e analisados os três

restantes. Para a análise mitocondrial, a intensidade da fluorescência foi medida delimitando-se os oócitos e medindo-se a intensidade da mesma no programa ImageJ. O software atribui valores de intensidade entre 0 e 255 para cada pixel na área selecionada e, em seguida, médias destes intensidades foram calculadas. Para a individualização das gotas lipídicas, no entanto, foi utilizada a ferramenta “nucleus counter” do programa ImageJ (Figura 6), ajustado para detectar, individualizar e quantificar a área das gotas.

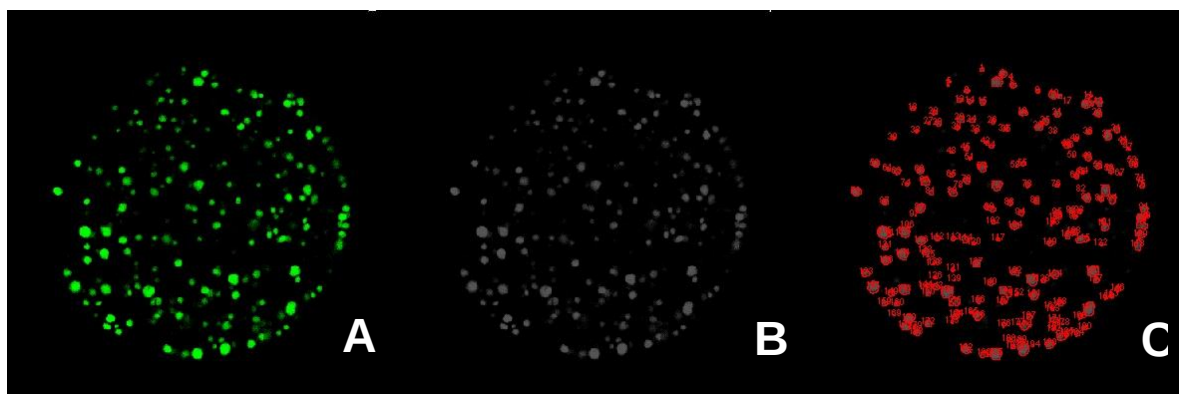


Figura 6. Processamento da imagem original (A) para a quantificação lipídica mediante o programa ImageJ. Depois de ajustar a escala e passar a imagem para 8 bits (B), as gotas lipídicas são individualizadas com a ferramenta “nucleus counter” (C) para posterior quantificação da área das mesmas.

Além da obtenção da quantidade lipídica por oócito, também foram classificadas as gotas de acordo com os tamanhos das mesmas. Foram avaliados 10 oócitos por grupo, e as gotas classificadas em pequenas ($<2\mu\text{m}$ de diâmetro), grandes ($2\text{--}6\mu\text{m}$) e gigantes ($>6\mu\text{m}$) como descrito por Abe et al. (2002)

Por último foi realizada a correlação entre quantidade de lipídeo (média da área) e mitocôndria (média da intensidade da fluorescência) em todos os grupos experimentais.

5.5.6. Avaliação mitocondrial e das gotas lipídicas em oócitos maturados *in vivo*.

5.5.6.1. Protocolo de sincronização e superestimulação das vacas doadoras e coleta dos oócitos maturados *in vivo*.

Para o presente experimento foram utilizadas seis vacas mestiças, cruzadas nelore, de aproximadamente três anos de idade. Esses animais foram mantidos a pasto de capim braquiária (*Brachiaria brizantha*) com acesso à água e sal proteinado *ad libitum*

No primeiro dia, foi realizada a punção folicular guiada por ultrassonografia (OPU) para a sincronização da onda folicular (Figura 7), e a aplicação do implante de progesterona (Sincrogest®, Ourofino Agronegócio, Cravinhos, SP, Brasil) que permaneceu por 7 dias nas seis vacas doadoras de oócitos. No dia 4 iniciou-se a superestimulação mediante doses decrescentes de FSH (Pluset®, Laboratórios Calier S.A, Barcelona, Espanha) completando-se 250UI de FSH por animal no dia 7. Foi aplicada uma dose de 2mL de PGF2 α (Sincrocio®, Ourofino) na tarde do dia 6, e 2mL de GnRH (Sincroforte®, Ourofino) 24 horas antes da coleta de oócitos, que foi realizada por OPU no dia 9.

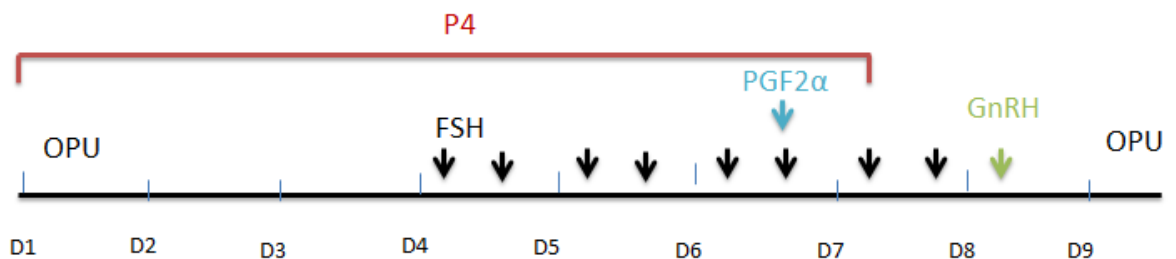


Figura 7. Protocolo de sincronização e superestimulação dos animais doadores de oócitos. As vacas foram sincronizadas após aspiração do folículo dominante mediante OPU e a superestimulação realizou-se mediante administração de doses decrescentes de FSH, sendo aplicada uma dose de GnRH 24 horas antes da OPU para a coleta de oócitos maduros.

5.5.6.2. Avaliação mitocondrial e lipídica dos oócitos coletados.

Depois de serem lavados e desnudados, os oócitos foram corados para a avaliação nuclear, junto à coloração mitocondrial e de lipídeos e avaliados em microscopia confocal. Foram utilizados 58 oócitos para avaliação da distribuição das organelas e 20 deles para a quantificação das mesmas. Todo o processo foi realizado como indicado no Experimento III e os dados foram comparados com aqueles obtidos a partir de oócitos maturados *in vitro*.

5.6. Experimento III: Avaliação do uso de SFB, BSA e combinação de ambos durante a MIV sobre o desenvolvimento embrionário.

A obtenção dos ovários, seleção dos COCs e a MIV foram realizadas como indicado no experimento anterior.

5.6.1. Processamento do sêmen e fecundação *in vitro*.

Depois da MIV dos oócitos e após a descongelação (37°C/30 segundos) do sêmen, o mesmo foi depositado em gradiente de Percoll 45% e 90% previamente preparado. Após centrifugação por 7 minutos a 3600xg, o sedimento suspenso foi removido, e então foram adicionados 500µL de meio de fecundação, procedendo-se nova centrifugação por 5 minutos a 520xg. Em seguida foi corrigida a dose de sêmen para 100×10^3 espermatozóides por microgota, avaliando-se concentração e motilidade espermática, e a mesma foi adicionada nas gotas de fertilização onde os espermatozoides, na presença de heparina, foram capacitados. Os oócitos maturados foram transferidos para as gotas após serem lavados duas vezes em meio TL-Sêmen. O meio de fecundação era composto por TALP-FIV, 6mg/mL de BSA-FAF, 83,4µg/mL de amicacina e, 0,2 mM piruvato de sódio, 10 µg / mL de heparina, 18 mM de penicilamina, 10 µM de hipotaurina e 1,8 µM de epinefrina, e as gotas cobertas por óleo mineral. As placas então foram incubadas para a

fecundação por 18 a 20 horas a 38,5 °C e atmosfera de 5% de CO₂. Sêmen do mesmo touro foi utilizado para todos os tratamentos e replicatas.

5.6.2. Cultivo *in vitro* de embriões.

Os prováveis zigotos foram transferidos da placa de FIV para uma gota contendo 150 µL de meio TL-Sêmen para a remoção das células do *cumulus* remanescentes por meio de pipetagens sucessivas. Após a remoção, os mesmos foram separados das células desagregadas e lavados duas a três vezes em meio SOFaa (fluido sintético de oviduto acrescido de aminoácidos). Em seguida, foram distribuídos em gotas contendo meio composto por SOF suplementado com 8mg/mL de BSA, 0,2mM de piruvato de sódio e 83,4µg/mL de amicacina. As placas foram incubadas em atmosfera controlada de 5% CO₂ e 5% O₂, e trocas de meio foram realizadas nos dias 3 e 6 do cultivo, sendo a duração do CIV de oito dias.

5.6.3. Quantificação das taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário.

Os embriões de duas ou mais células, no dia 3, foram considerados clivados, e as taxas de blastocistos foram avaliadas no oitavo dia após a fecundação.

5.7. Experimento IV: Quantificação lipídica dos embriões produzidos *in vitro* após MIV em diferentes meios.

Blastocistos iniciais obtidos a partir dos diferentes grupos (GBSA – n = 61, GSFB - n = 66 e GB+S - n = 79) foram avaliados quanto ao acúmulo lipídico em microscopia confocal, como indicado para oócitos no experimento II, e 15 blastocistos nos quais foi possível separar visualmente as gotículas, foram selecionados para o estudo do tamanho das gotas (Figura 8). Neste caso, para a quantificação lipídica somente foi utilizado o corte com maior área.

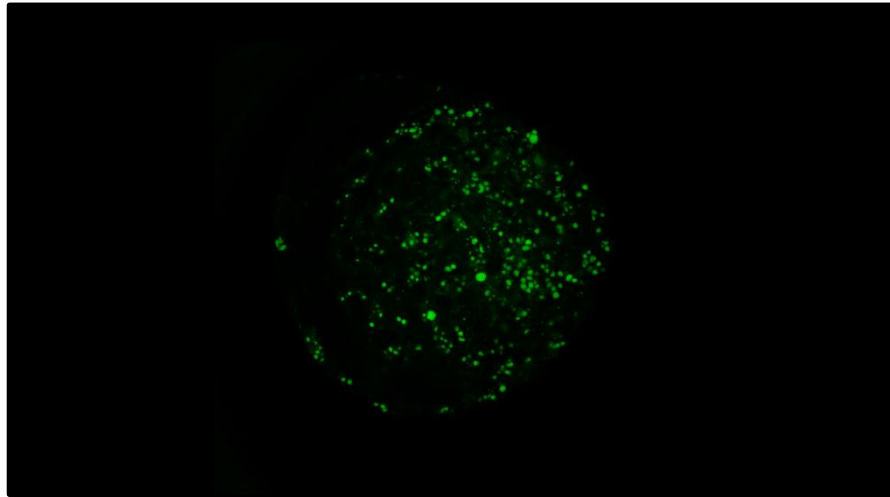


Figura 8. Imagem representativa de um blastocisto corado com LipidTox Green Neutral Lipid Stain (Molecular Probes).

5.8. Experimento V: Análise da expressão dos genes *DGAT2* e *PLIN2* em células do *cumulus*, oócitos imaturos e maduros, e embriões produzidos a partir de diferentes meios durante a MIV.

5.8.1. Colheita das amostras

Foram coletados três “*pools*” de células do *cumulus* (provenientes de 50 COCs) e três “*pools*” de oócitos desnudos (provenientes de 90 COCs) imaturos e maduros nos diferentes meios de MIV. Os COCs foram desnudados, e quando destinados à colheita de oócitos desnudos, foram retirados dos respectivos tratamentos e congelados. No caso das células do *cumulus*, depois de desnudar os COCs, os oócitos foram descartados e o fluido contendo as células do *cumulus* centrifugado a 1600 xg por 15 minutos para que depois o sobrenadante fosse também descartado e o sedimento congelado até sua utilização.

No caso dos embriões, três “*pools*” de 30 embriões cada produzidos *in vitro* provenientes dos diferentes tratamentos de MIV foram coletados e congelados.

5.8.2. PCR-RT do RNA das amostras

A extração do RNA das amostras foi realizada com o kit comercial Rneasy Protect Micro (Qiagen) segundo as instruções do fabricante. No caso das amostras das células do *cumulus*, a concentração de RNA foi medida no espectrofluorímetro (NanoDrop) para ajuste do conteúdo de RNA das amostras.

Para realizar a transcrição reversa (síntese DNA complementar), foi utilizado o primer oligodT e o kit Superscript III (Invitrogen) segundo recomendações do fabricante. Em seguida, foi realizada a reação de PCR em tempo real no aparelho Mx3005P QPCR system da Stratagene (La Jolla, CA) utilizando-se para cada reação de PCR de 20 µL, o QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen), 2 µL de RT da amostra e 1 µL de primers específicos. Os primers dos genes PLIN2 e DGAT2 foram obtidos a partir do genoma bovino publicado no “genome browser” da UCSC (<http://genome.ucsc.edu>) e sintetizados na Sigma Aldrich. O primer GAPDH, usado como gene controle endógeno, foi comercializado pela empresa Promidol (Alere™, Belo Horizonte, MG, Brasil). As sequências dos primers foram: PLIN2 (149 pb) F: 5′ TGCACTCACCAAATCAGAGC 3′, R: 5′ GCAGCTTGGTGGACAGAGAT 3′; DGAT2 (152 pb): F: 5′ TTGGCTCAATAGGTCCAAGG 3′, R: 5′ TGAAGTAGAGCACGGCAATG 3′; GAPDH: (NM_001034034, 76pb) F: 5′ AAGGCCATCACCATCTTCCA 3′, R: 5′ CCACTACATACTCAGCACCAGCAT 3′.

As reações de PCR foram conduzidas em triplicatas para cada amostra. As condições aplicadas foram de 95°C por 15 min, seguido por 40 ciclos de 94°C por 15 s (separação das fitas), 60°C por 33 s (anelamento) e 72°C por 33 s (extensão). Em seguida, teve uma fase de 95°C e 41 ciclos a 55°C por 33 segundos aumentando 1°C em cada ciclo, para a chamada “melting curve” para análise de especificidade dos primers na reação.

A expressão foi determinada pela quantificação relativa do gene selecionado, em relação à sua curva padrão, ajustado pelo gene de controle endógeno GAPDH.

5.9. Análise estatística.

As taxas de maturação nuclear e citoplasmática (migração de grânulos corticais, gotas lipídicas e mitocôndrias, Experimento II), assim como as taxas de desenvolvimento embrionário (Experimento III), foram avaliadas mediante o teste Qui-Quadrado (X^2) ou, quando apropriado, pelo teste exato de Fisher. Tanto a quantificação lipídica (lipídeos totais e tamanho das gotas) nos oócitos e embriões, quanto a quantificação mitocondrial durante a MIV (Experimentos II e IV) foram avaliados pelo teste não paramétrico de Mann Whitney, e a correlação da quantidade de ambas organelas nos oócitos pelo teste de regressão lineal r^2 e a significância da correlação pelo teste F. Para a avaliação da expressão dos genes (Experimento V), foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) e teste Duncan's Multiple Range Test para comparação das médias. Os resultados foram analisados no programa GraphPad Instat 6.01, com exceção dos dados de expressão gênica que foram avaliados pelo programa XLStat (2012).

6. RESULTADOS

6.1. Experimento I: Quantificação e análise do perfil lipídico do SFB e cálculo do teor lipídico dos meios de MIV.

Por meio da técnica de cromatografia de gás, foi determinado o valor de gordura total do suplemento SFB, que foi de 0,029g/100mL (Tabela 1). A partir disso, foram calculadas as quantidades de lipídeos adicionadas ao meio de MIV em cada grupo. O GSFB possui 10% de SFB e, portanto, 0,029mg de lipídeo em cada mL de meio MIV preparado. Considerando o valor lipídico máximo da BSA-FAF de 0,02%, como indicado pelo fabricante, o meio do GBSA (8mg/mL de BSA-FAF) continha apenas 0,0016mg de lipídeos por mL, e o meio suplementado com ambos

compostos, 5%SFB+ 6mg/mL BSA-FAF (GB+S), obteve um teor lipídico de 0,0157mg/mL. Assim, demonstrou-se que os oócitos do GSFB foram expostos a um meio de maturação com dezoito vezes mais lipídeos que os oócitos do GBSA e com o dobro de lipídeos em comparação ao meio do GB+S.

Tabela 1. Quantidade lipídica dos meios de MIV dos diferentes grupos (GBSA, GSFB e GB+S).

	GBSA	GSFB	GB+S
mg de lipídeo/mL	0,0016	0,029	0,0157

A amostra de SFB foi injetada no cromatógrafo e separada em diferentes ácidos graxos (Figura 9), sendo que no gráfico, cada pico representa um ácido graxo e cada área determina a proporção desse ácido na amostra. A partir desses resultados, e mediante o padrão interno, obteve-se o perfil lipídico do SFB (Tabela 2). Observou-se que os ácidos predominantes no soro foram os ácidos palmítico (23,4%), esteárico (17,71%) e oleico (15,24%).

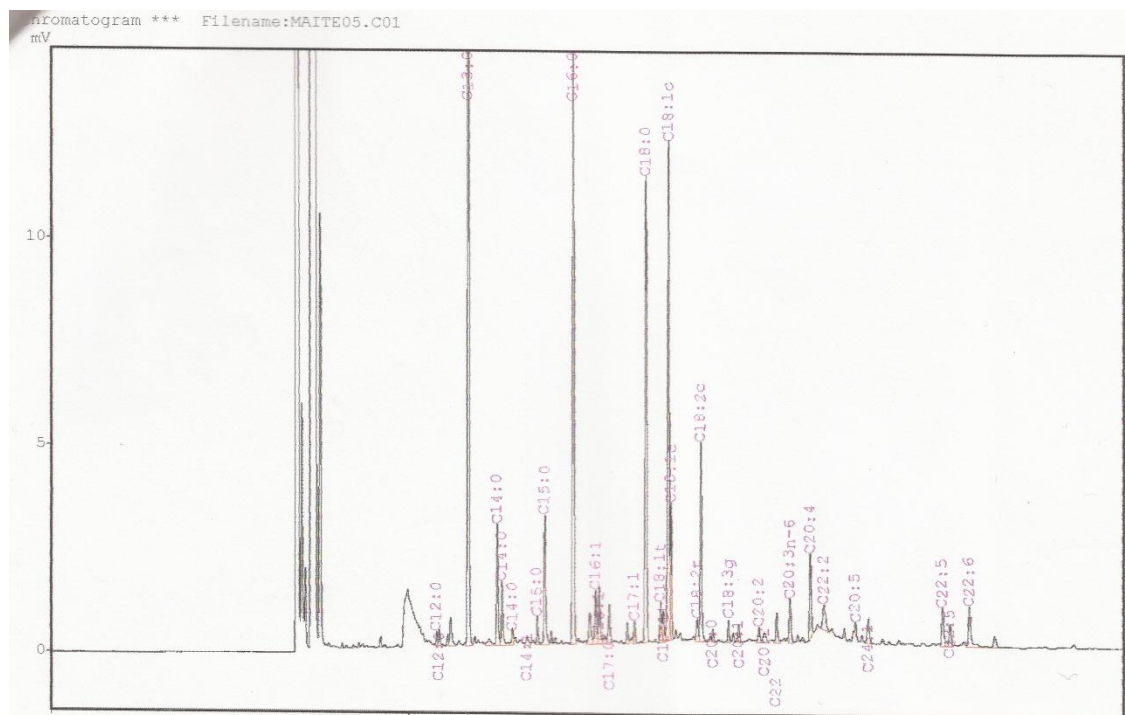


Figura 9. Gráfico da cromatografia do SFB, onde cada pico refere-se a um ácido graxo e cada área determina a proporção que esse ácido representa na amostra.

Ademais, quase metade dos ácidos do SFB detectados foram ácidos saturados (47,2%), sendo que foram verificados 22,4% e 16,57% de ácidos monoinsaturados e polinsaturados, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 2. Perfil lipídico do SFB (Cripion). Fórmula, nome, quantidade (mg/100mL) e porcentagem (% área) que representam cada ácido graxo detectado na cromatografia de gás.

FÓRMULA	NOME	mg/100mL	% AREA
12:0	Láurico	0,11 ± 0,07	0,32 ± 0,28
14:0	Mirístico	0,68 ± 0,35	2,59 ± 1,02
15:0	Pentadecanóico	0,52 ± 0,46	1,07 ± 0,52
16:0	Palmítico	6,82 ± 1,08	23,40 ± 1,74
16:1 (n-7)	Palmitoléico	0,68 ± 0,14	2,27 ± 0,22
17:0	Margárico	0,42 ± 0,05	1,43 ± 0,07
17:1 (n-7)	Heptadecenóico	0,24 ± 0,03	0,72 ± 0,18
18:0	Estearico	5,16 ± 0,77	17,71 ± 3,51
18:1 (n-9)	Oleico	5,01 ± 0,74	15,24 ± 1,01
18:1 (n-7)	Vacênico	1,09 ± 0,5	3,51 ± 0,47
18:2 (n-6)	Linoleico	1,51 ± 0,48	5,13 ± 1,12
20:0	Eicosanóico	0,14 ± 0,07	0,49 ± 0,17
20:1 (n-9)	Eicosenóico	-	-
18:3 (n-3)	A-Linolênico	0,17 ± 0,16	0,67 ± 0,42
22:0	Docosanóico	0,28 ± 0,05	0,88 ± 0,17
22:1	Docosenóico	-	-
20:3 (n-6)	Eicotrienóico	0,40 ± 0,08	1,24 ± 0,41
20:4 (n-6)	Araquidônico	1,01 ± 0,09	3,10 ± 0,56
24:0	Lignocérico	-	-
20:5 (n-3)	Eicosapentaenóico	0,42 ± 0,40	1,56 ± 1,17
24:1	Nervônico	0,33 ± 0,12	0,65 ± 0,38
22:5 (n-3)	Docosapentaenóico	0,50 ± 0,09	1,45 ± 0,31
22:6 (n-3)	Docosaheptaenóico	0,99 ± 0,81	3,42 ± 2,37

Tabela 3. Quantidade de ácidos saturados, monoinsaturados, polinsaturados e lipídeos trans da amostra SFB detectada na cromatografia gasosa.

NOME	mg/100mL	% AREA
Saturados	13,88 ± 2,14	47,2 ± 4,87
Monoinsaturados	7,3 ± 0,79	22,4 ± 1,58
Polinsaturados	4,99 ± 1,67	16,57 ± 3,48
Trans	0,46	1,50 ± 0,73

6.2. Experimento II. Avaliação do efeito da suplementação com SFB, BSA e sua combinação durante a MIV sobre a maturação oocitária.

6.2.1. Avaliação da progressão nuclear e migração de grânulos corticais (GC)

Oócitos oriundos das mesmas rotinas de MIV foram utilizados para a avaliação da maturação nuclear e migração dos GC (Tabela 4), sendo utilizados oócitos de cinco repetições. Houve diferença no número de oócitos que atingiram a fase de MII com extrusão do primeiro corpúsculo polar, sendo que o GBSA (75%) não conseguiu alcançar as taxas observadas nos GSFB (88,9%) e GB+S (89,6%). Sobre a taxa de oócitos com os GC localizados na periferia, houve uma diminuição no grupo GBSA(43,9%) quando comparado ao grupo GSFB (62,4%), sendo que ambos não diferiram do grupo GB+S (Tabela 4).

Tabela 4. Taxas de oócitos bovinos maduros (em MII, como definido pela maturação nuclear) e com GC dispostos na periferia após 24 horas de maturação *in vitro* nas diferentes suplementações (GBSA: 8mg/mL de BSA-FAF, GSFB: 10%SFB e GB+S: 6mg/ml de BSA-FAF + 5% SFB). Jaboticabal, 2012.

Grupos	Oócitos em MII n (%)	Oócitos com GC na periferia n (%)
GBSA	69/92 (75,0) ^a	54/123 (43,9) ^a
GSFB	104/117 (88,9) ^b	78/125 (62,4) ^b
GB+S	95/106 (89,6) ^b	58/113 (51,3) ^{ab}

^{a,b}Valores com sobrescritos diferentes entre linhas dentro de uma mesma coluna diferem pelo teste χ^2 ($p < 0,05$).

6.2.2 Avaliação da distribuição das mitocôndrias e gotas lipídicas em oócitos imaturos e oócitos submetidos à MIV ou à maturação *in vivo*.

O objetivo desse experimento foi a avaliação do comportamento mitocondrial e lipídico dos oócitos durante a MIV e as diferenças que apresentam em comparação aos oócitos maturados *in vivo*. Para isso, foram comparados resultados de oócitos imaturos com aqueles maturados *in vitro* (GBSA, GSFB e GB+S) e *in vivo* (Tabela 5).

O grupo imaturo diferiu de todos os outros grupos, apresentando uma taxa de 93,2% de oócitos com mitocôndrias na região periférica. Com relação aos demais grupos, GBSA e GB+S foram semelhantes entre si, porém, com valores maiores que GSFB e *in vivo*, que por sua vez, foram similares estatisticamente (Tabela 5). Quanto à presença da categoria transição, oócitos imaturos (0%) e maturados *in vivo* (10,34%) diferiram de todos os outros grupos e também entre si, com exceção do GBSA que não mostrou diferença com relação aos maturados *in vivo*. A maior taxa de oócitos com mitocôndrias dispersas foi observada no grupo *in vivo* (51,7%), que foi superior ($p < 0,05$) a todos os grupos. O grupo GSFB, com 32,2% dos oócitos apresentando mitocôndrias localizadas de forma dispersa no citoplasma, também apresentou diferenças em comparação aos demais grupos (Tabela 5).

Quanto à migração das gotas lipídicas, o grupo imaturo apresentou 61% dos oócitos com as gotas dispostas na periferia, e diferiu de todos os grupos maduros (GBSA:11,5%, GSFB:3,1%, GB+S: 4,5% e *in vivo*: 20,7%). Os grupos GSFB e GB+S não mostraram diferenças entre si, porém, foram inferiores aos grupos GBSA e *in vivo* que por sua vez, também foram similares.

Tabela 5. Taxas de oócitos nas diferentes categorias de localização de mitocôndrias (periferia, transição e disperso) e gotas lipídicas (periferia e disperso) tanto em oócito imaturo, como nos maduros *in vitro* (GBSA, GSFB e GB+S) e *in vivo*. Jaboticabal, 2012.

Grupos	MITOCONDRIAS			LIPÍDEOS	
	Periferia n (%)	Transição n (%)	Disperso n (%)	Periferia n (%)	Disperso n (%)
IMATURO	55/59 (93,2) ^a	0/59 ^a	4/59 (6,8) ^a	36/59 (61) ^a	23/59 (39) ^a
GBSA	42/61 (68,8) ^b	12/61 (19,7) ^{b,c}	7/61 (11,5) ^a	17/61 (27,9) ^b	44/61 (72,1) ^b
GSFB	25/65 (38,5) ^c	19/65 (29,23) ^b	21/65 (32,3) ^b	2/65 (3,1) ^c	63/65 (96,9) ^c
GB+S	33/66 (50) ^b	23/66 (34,8) ^b	10/66 (15,1) ^a	3/66 (4,5) ^c	63/66 (95,4) ^c
IN VIVO	22/58 (37,9) ^c	6/58 (10,34) ^c	30/58 (51,7) ^c	12/58 (20,7) ^b	46/58 (79,3) ^b

^{a,b,c} Valores com sobrescritos diferentes entre linhas dentro de uma mesma coluna diferem entre si (p<0,05, Qui-quadrado).

Para se ter uma melhor compreensão sobre os acontecimentos nos oócitos maturados *in vivo*, os mesmos foram separados em maduros (em MII) e imaturos e avaliados quanto à distribuição das mitocôndrias e dos lipídeos (Tabela 6). A localização das gotas lipídicas diferiu de acordo com o *status* de maturação nuclear. Quando em MII (38/58 - 65,5% dos oócitos), 100% dos oócitos (n=38) apresentaram as gotas dispostas homogeneamente no citoplasma, enquanto somente 40% dos oócitos imaturos (n=8) apresentaram essa categoria. Sobre a migração das mitocôndrias, não houve diferenças entre os grupos quanto às categorias de transição e disperso, apenas em relação aos oócitos com mitocôndrias localizadas na periferia do citoplasma.

Tabela 6. Taxas de oócitos nas diferentes categorias de localização de mitocôndrias (periferia, transição e disperso) e gotas lipídicas (periferia e disperso) nos oócitos maturados *in vivo*, separando-se maduros (MII) de imaturos.

Grupos	MITOCONDRIAS			LIPÍDEOS	
	Periferia n (%)	Transição n (%)	Disperso n (%)	Periferia n (%)	Disperso n (%)
IMATURO	11/20 (55%) ^a	0/20 (0%) ^a	9/20 (45%) ^a	12/20 (60%) ^a	8/20 (40%) ^a
MI	11/38 (28,9%) ^b	6/38 (15,8%) ^a	21/38 (55,3%) ^a	0/38 (0%) ^b	38/38 (100%) ^b

^{a,b} Valores com sobrescritos diferentes entre linhas dentro de uma mesma coluna diferem entre si (p<0,05, Qui-quadrado).

6.2.3. Avaliação da quantidade de mitocôndrias e lipídeos em oócitos imaturos, submetidos à MIV e maturados *in vivo*.

Inicialmente, foi constatado que a MIV provocou um aumento no acúmulo lipídico em todos os grupos (Figura 10). Oócitos que foram expostos a 10% de SFB ao longo da MIV (GSFB) acumularam mais lipídeos (média de área total = $746,9 \mu\text{m}^2$) do que aqueles do grupo GBSA, maturados exclusivamente com BSA-FAF (média = $565,1 \mu\text{m}^2$). Não se observou diferença estatística entre o grupo GB+S e os grupos GBSA e GSFB. Ao contrário dos grupos maturados *in vitro*, em que se pode observar um aumento lipídico nos oócitos ao final da maturação, o grupo *in vivo* não apresentou esse aumento, com média similar àquela observada em oócitos imaturos, indicando ausência de acúmulo lipídico no processo de maturação fisiológica.

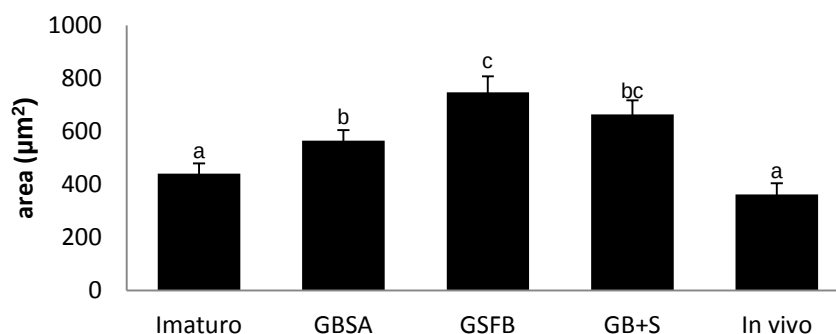


Figura 10 Área média de gotas lipídicas (μm^2 de lipídeo/oócito) em oócitos imaturos, maturados *in vitro* nos diferentes meios (GBSA: 8mg/mL de BSA-FAF, GSFB: 10%SFB e GB+S: 6mg/ml de BSA-FAF + 5% SFB) e maturados *in vivo*. As colunas com diferentes letras diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste Mann Whitney.

Embora tenha ocorrido um acúmulo lipídico durante a MIV, quando se analisou a quantidade de mitocôndrias ativas por meio de fluorescência, somente o GBSA sofreu aumento na quantidade de mitocôndrias ativas depois da maturação (Imaturo: 11,92 de intensidade de fluorescência e GBSA: 15,61; Figura 11). Os oócitos maturados com 10% SFB (GSFB) apresentaram valores menores (11,7) que os oócitos do grupo GBSA. Já o grupo *in vivo* obteve a menor média de atividade

mitocondrial (8,22), diferindo dos demais grupos, com exceção do grupo GSFB (Figura 11).

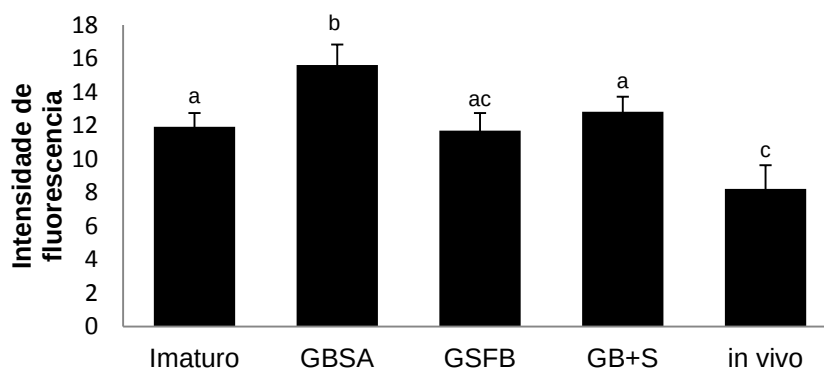


Figura 11. Avaliação da quantidade de mitocôndrias ativas (intensidade/oócito) dos oócitos imaturos e maturados *in vitro* (GBSA: 8mg/mL de BSA-FAF, GSFB: 10%SFB e GB+S: 6mg/ml de BSA-FAF + 5% SFB) e *in vivo* pela quantificação da intensidade da fluorescência do corante Mitotracker Red CMXRos. As colunas com diferentes letras diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste Mann Whitney.

Mesmo ocorrendo um acúmulo de lipídeos durante a MIV, mais pronunciado no GSFB, não se constatou diferenças entre os grupos em relação aos tamanhos das gotas lipídicas ($< 2 \mu\text{m}$, $2-6 \mu\text{m}$ ou $> 6 \mu\text{m}$ de diâmetro) nos oócitos (Figura 12).

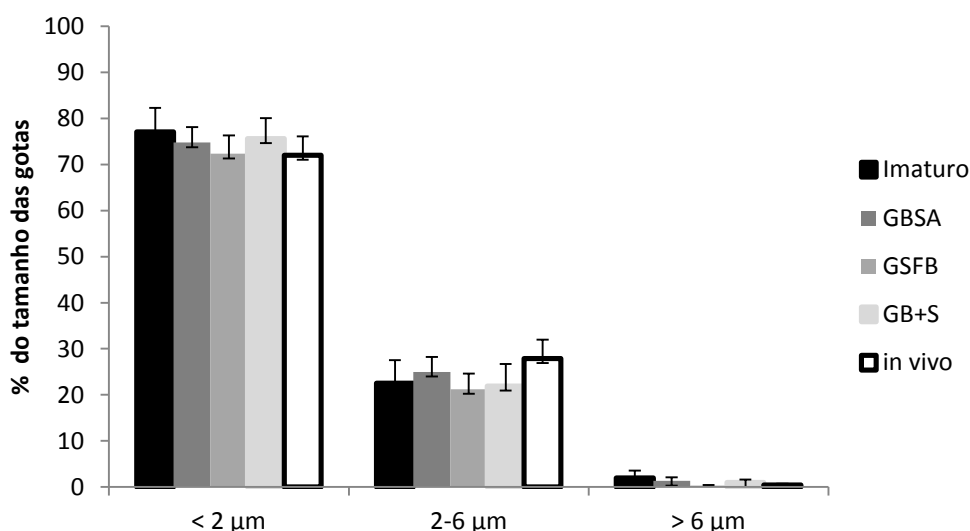


Figura 12. Avaliação do tamanho das gotas lipídicas de oócitos imaturos, maturados *in vitro* (GBSA: 8mg/mL de BSA-FAF, GSFB: 10%SFB e GB+S: 6mg/ml de BSA-FAF + 5% SFB) e *in vivo*, que foram classificadas em $< 2 \mu\text{m}$, $2-6 \mu\text{m}$ ou $> 6 \mu\text{m}$ de diâmetro. Não houve diferença estatística entre grupos (Mann Whitney).

Ainda, foi possível observar que os oócitos maturados *in vivo* foram os únicos que mantiveram uma correlação entre a quantidade de lipídeos e mitocôndrias ativas ($r^2 = 0,7317$; $p = 2,48 \cdot 10^{-6}$) (Figura 13).

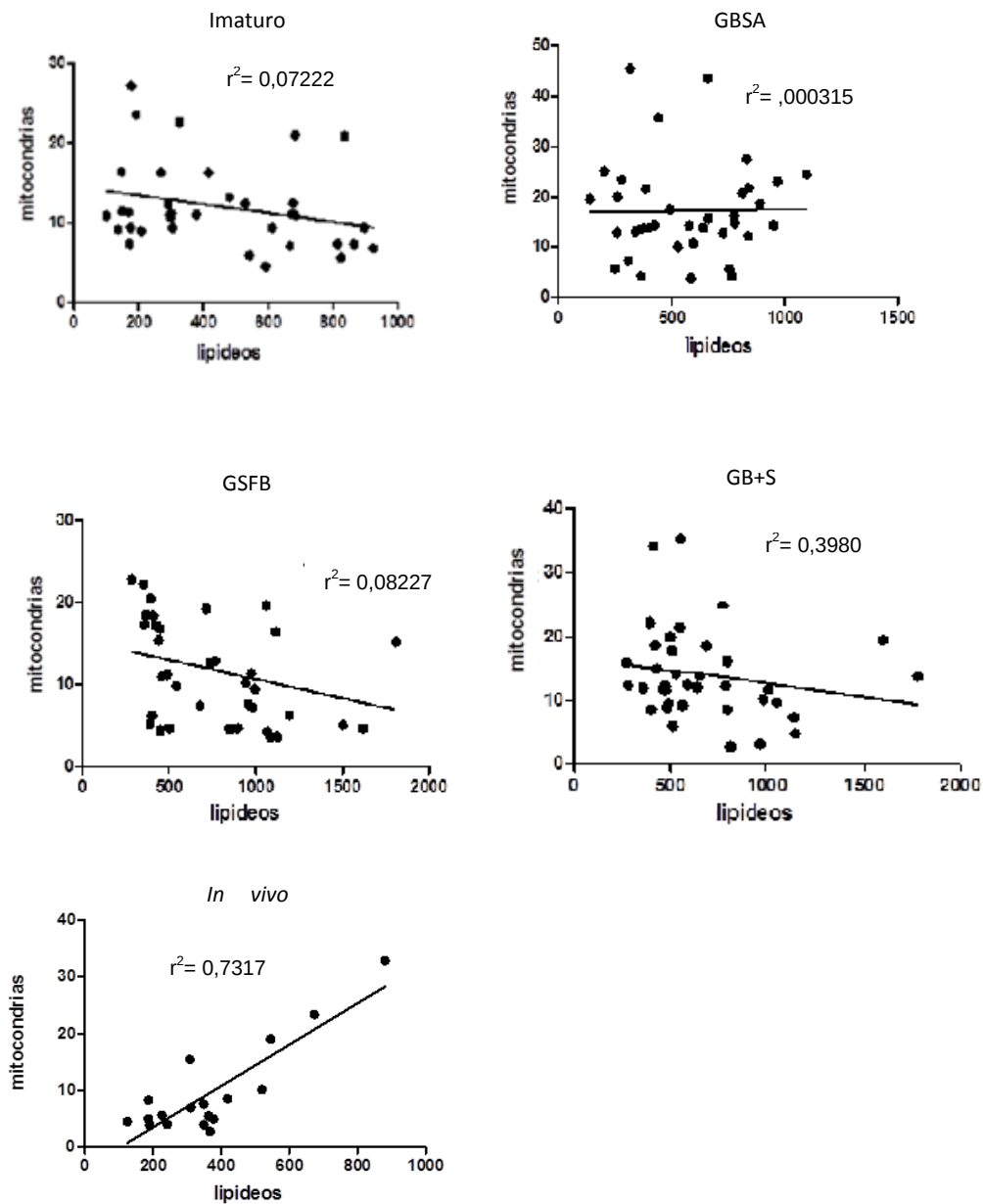


Figura 13. Gráficos de correlação entre quantidade de mitocôndrias ativas e gotas lipídicas em oócitos dos grupos imaturos, GBSA, GSFB, GB+S e *in vivo* mediante teste de regressão lineal r^2 . A significância da correlação foi realizada pelo teste F.

6.3. Experimento III: Efeitos do uso de SFB, BSA e combinação de ambos durante a MIV sobre o desenvolvimento embrionário.

Na avaliação da influência das diferentes fontes e/ou concentrações de fontes proteicas durante a MIV sobre as taxas de PIVE, houve diferenças entre os grupos tanto nas taxas de clivagem quanto nas taxas de desenvolvimento até blastocistos. O grupo suplementado com BSA-FAF durante a MIV (GBSA) foi inferior aos outros dois grupos tanto nas taxas de clivagem (GBSA: 87,38%; GSFB: 91,05%; GB+S: 90,3%) quanto na produção de blastocistos (GBSA: 19,79%; GSFB: 36,25%; GB+S: 34,65%)(Tabela 7.). Por sua vez, os grupos GSFB e GB+S foram similares entre si.

Tabela 7. Taxas de clivagem e de blastocistos após MIV de oócitos em diferentes meios (GBSA: 8mg/mL de BSA-FAF, GSFB: 10%SFB e GB+S: 6mg/mL de BSA-FAF + 5%SFB), fecundação e cultivo *in vitro* por 8 dias na ausência de SFB.

Grupos	Clivados	Blastocistos
	n (%)	n (%)
GBSA	1232/1410 (87,38) ^a	279/1410 (19,79) ^a
GSFB	844/927 (91,05) ^b	336/927 (36,25) ^b
GB+S	959/1062 (90,30) ^b	368/1062 (34,65) ^b

^{a,b}Valores com sobrescritos diferentes entre linhas dentro de uma mesma coluna diferem pelo teste χ^2 ($p < 0,05$).

6.4. Experimento IV: Quantificação lipídica dos embriões PIV

O resultado da quantificação lipídica embrionária foi dado de acordo com a média da área lipídica por embrião e grupo. As diferentes suplementações e/ou concentrações durante a MIV não interferiram no acúmulo lipídico dos subsequentes blastocistos produzidos (Figura 14). Porém, houve diferença em relação aos tamanhos das gotas lipídicas. Nos embriões do GSFB verificou-se maior porcentagem de gotas lipídicas com diâmetro entre 2 a 6 μ m em comparação aos embriões do GB+S (Figura 15).

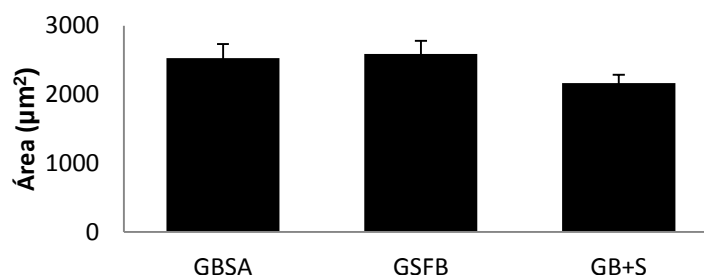


Figura 14. Efeitos dos diferentes meios MIV (GBSA: 8mg/mL de BSA-FAF, GSFB: 10%SFB e GB+S: 6mg/ml de BSA-FAF + 5% SFB) no acúmulo lipídico embrionário (μm^2 de lipídeo/embrião). Os dados são mostrados pela média da área lipídica/embrião dos diferentes grupos de blastocistos. Não houve diferença estatística entre grupos (Mann Whitney).

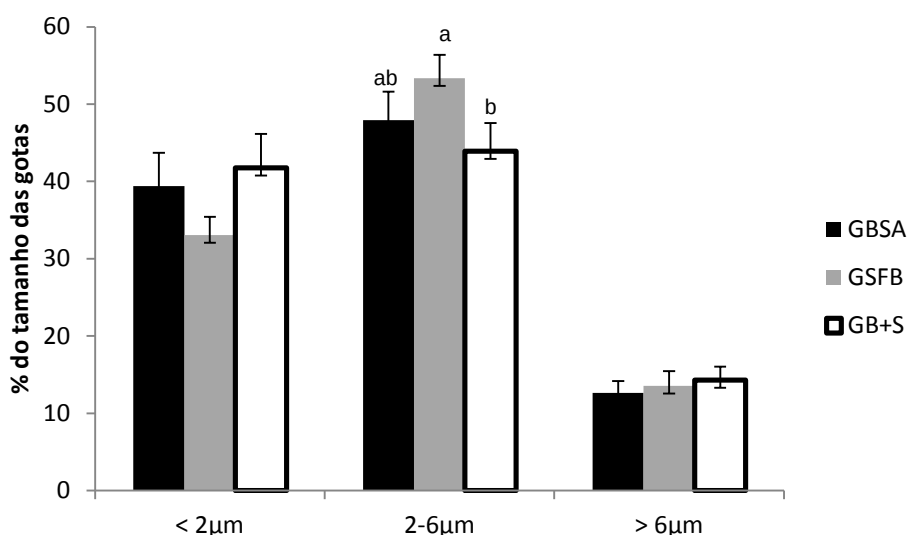


Figura 15. Efeitos dos diferentes meios de MIV (GBSA: 8mg/mL de BSA-FAF, GSFB: 10%SFB e GB+S: 6mg/ml de BSA-FAF + 5% SFB) sobre o tamanho das gotas lipídicas nos embriões, classificadas em <2 μm , 2-6 μm ou >6 μm de diâmetro. As barras com diferentes letras dentro de cada tamanho diferem entre si ($p < 0,05$, Mann Whitney).

A Figura 16 mostra o padrão de acúmulo lipídico em oócitos submetidos à MIV nas diferentes suplementações proteicas e nos blastocistos produzidos a partir desses tratamentos, sendo possível observar a dinâmica dos lipídeos ao longo da PIVE em bovinos. Embora tenha ocorrido um aumento na área média de lipídeos nos oócitos durante a MIV, percebe-se que a maior atividade lipídica ocorreu após a fertilização, ou seja, durante o CIV. Como representado na Figura 17, além do

aumento da quantidade lipídica, também ocorre um aumento da porcentagem de gotas maiores que 2 μ m de diâmetro ao longo da PIVE, podendo-se perceber que o tamanho maioritário durante a MIV é menor que 2 μ m, enquanto nos embriões predomina o tamanho entre 2 a 6 μ m.

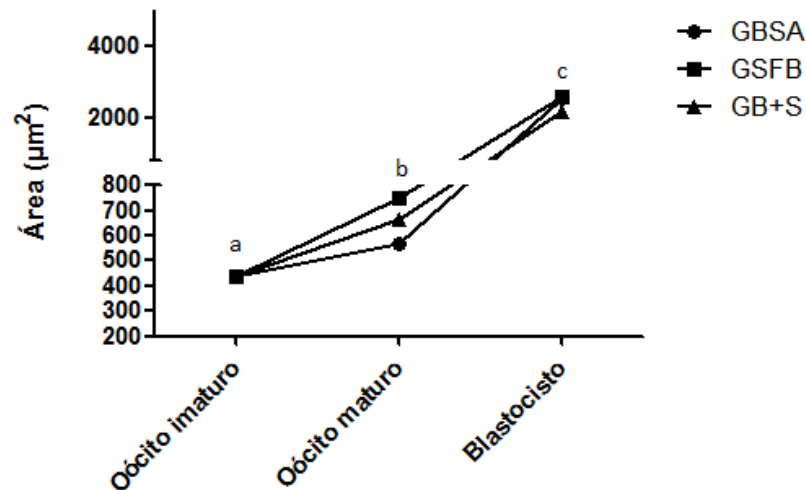


Figura 16. Influência dos suplementos durante a MIV (GBSA: 8mg/mL de BSA-FAF, GSFB: 10%SFB e GB+S: 6mg/mL de BSA-FAF + 5% SFB) na dinâmica do acúmulo lipídico ao longo da PIVE bovinos. Letras diferentes entre diferentes estágios do desenvolvimento (oócito imaturo, maduro e blastocisto) diferem entre si ($p < 0,05$, Mann Whitney)

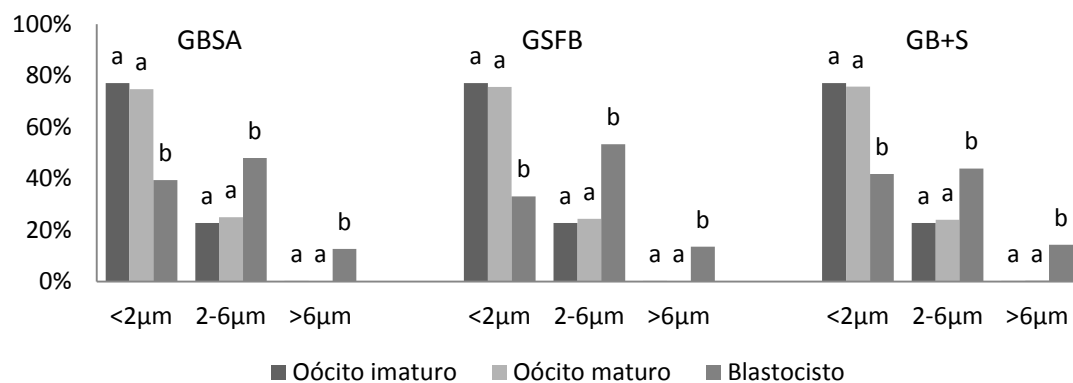


Figura 17. Influência de diferentes suplementos proteicos durante a MIV (GBSA: 8mg/mL de BSA-FAF, GSFB: 10%SFB e GB+S: 6mg/ml de BSA-FAF + 5% SFB) sobre o tamanho de gotas lipídicas ao longo da PIVE em bovinos. Letras diferentes dentro de cada tamanho de gota e grupo diferem entre si ($p < 0,05$, Mann Whitney).

6.5. Experimento V: Análise da expressão dos genes *DGAT2* e *PLIN2* em células do *cumulus*, oócitos imaturos e maduros, e em embriões.

Os genes *DGAT2* e *PLIN2* apresentaram comportamentos diferentes de expressão nas células do *cumulus* (Figura 18). Houve diminuição ($p<0,05$) na expressão do *DGAT2* durante a maturação, porém, aumentada expressão do *PLIN2*, sem diferenças entre os grupos para os dois genes. Nos oócitos desnudos, observou-se diminuição ($p<0,05$) nos níveis de RNAm do gene *DGAT2* naqueles maturados em meio suplementado com 10% de SFB (GSFB) em comparação ao grupo imaturo, sem que diferenças entre os outros grupos fossem notadas. A maturação não causou efeitos sobre a expressão do *PLIN2* nos oócitos (Figura 18). Com relação aos blastocistos, as diferentes suplementações durante a MIV não interferiram na expressão de ambos os genes, *DGAT2* e *PLIN2*.

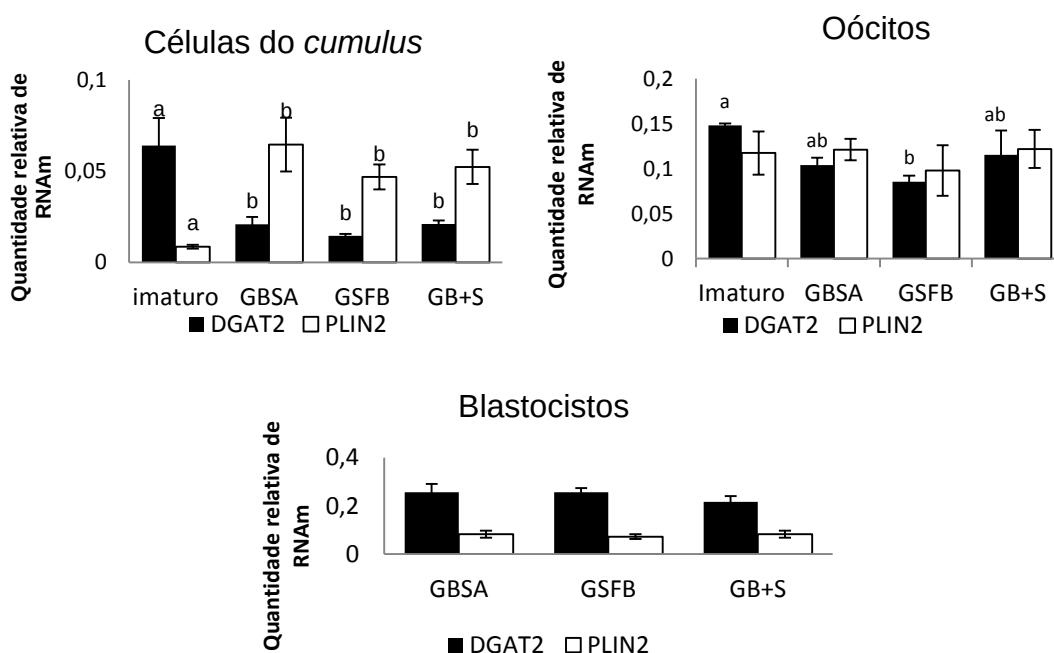


Figura 18. Expressão dos genes *DGAT2* e *PLIN2* nas células do *cumulus* e oócitos desnudos imaturos e maduros nos diferentes grupos de MIV (GBSA: 8mg/mL de BSA-FAF, GSFB: 10%SFB e GB+S: 6mg/ml de BSA-FAF + 5% SFB) e nos subsequentes blastocistos produzidos. Letras diferentes para o mesmo gene mostram diferenças entre si ($p<0,05$) pelo teste de Duncan.

7. DISCUSSÃO

O objetivo principal desse trabalho foi avaliar a influência da suplementação com SFB e/ou BSA na MIV sobre o acúmulo lipídico oocitário e embrionário. Para isso, foi necessário determinar o conteúdo lipídico dos meios de maturação e acredita-se que esse estudo tenha sido o primeiro a determinar a quantidade total lipídica do SFB. Confirmaram-se as várias suspeitas de que o SFB tem uma quantidade de ácidos graxos bem superior ao composto BSA-FAF (A8806). Essa informação reforça a hipótese de que o maior acúmulo lipídico encontrado em oócitos maturados na presença de SFB (KIM *et al.*, 2001 e FERGUSON E LEESE, 1999) pode ser resultado, em parte, do transporte de lipídeos do meio de cultivo até o citoplasma oocitário.

O ácido graxo mais concentrado no soro foi o ácido palmítico, seguido dos ácidos esteárico e oleico. Esses dados não estão plenamente de acordo com os achados de outros estudos. Dois trabalhos relatam as porcentagens dos ácidos graxos do SFB mediante à cromatografia gasosa, e mesmo havendo uma proporção muito alta desses ácidos, o mais encontrado em ambos os estudos foi o ácido linoleico (SATA *et al.*, 1999 e KIM *et al.*, 2001). Em contrapartida, o perfil oocitário e embrionário relatado nos referidos trabalhos, quando utilizado o SFB durante a MIV, estão de acordo com os achados do presente estudo, ou seja, com prevalência do ácido palmítico. Ademais, um estudo recente possibilitou a obtenção de dados mais precisos a partir da técnica de espectrometria de massas (MADI-TOF MS) (FERREIRA *et al.*, 2010), em que se verificou que o ácido graxo presente em maior concentração no oócito imaturo é o ácido palmítico, seguido dos ácidos esteárico e oleico. Além disso, os autores observaram que o cultivo com SFB aumenta a concentração do ácido palmítico e diminui a do oleico, em comparação à BSA.

Sabe-se que ácidos graxos saturados tem a capacidade de penetrar em oócitos bovinos (ADAMIAK *et al.*, 2006). Considerando-se que praticamente a metade dos ácidos encontrados no soro foi de ácidos saturados, parece razoável pensar que os mesmos estejam presentes em maior proporção nos oócitos e embriões expostos ao SFB. Assim, é provável que ocorra o transporte desses ácidos graxos a partir do meio de cultivo.

Embora os ácidos palmítico e esteárico sejam o segundo e o terceiro ácidos mais abundantes no fluido folicular bovino (LEROY *et al.*, 2005b), uma alta concentração desses compostos pode influenciar negativamente na PIVE. Têm sido descritos efeitos prejudiciais desses ácidos, na maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário (LEROY *et al.*, 2005a), bem como no metabolismo celular, aumentando os níveis de apoptose nas células embrionárias (JUNGHEIM *et al.*, 2011).

Já o ácido oleico, o mais abundante no fluido folicular, possui efeitos benéficos na maturação e desenvolvimento embrionário (AARDEMA *et al.*, 2011). Porém, no SFB, esse ácido está presente em menores concentrações em comparação aos ácidos palmítico e esteárico.

Como já mencionado, o oócito imaturo tem altas concentrações de ácido palmítico (FERREIRA *et al.*, 2010). Porém, quando cultivado em SFB, o mesmo é exposto a um meio com maior concentração desse ácido em comparação ao meio fisiológico, ou seja, o fluido folicular (LEROY *et al.*, 2005b). Portanto, a diferença entre os perfis de ácidos no fluido folicular bovino e no SFB pode causar um acúmulo de ácidos diferentes durante o processo de maturação, podendo levar a diferenças entre a maturação *in vivo* e *in vitro*.

No presente trabalho, oócitos expostos à BSA durante a MIV apresentaram diminuição das taxas de maturação nuclear e migração dos GC. Avelino (2004) já havia descrito essa diminuição na migração dos GC em oócitos maturados com BSA. O SFB é um meio rico em fatores de crescimento e compostos que melhoram a expansão das células do *cumulus* (Abe e Hoshi, 2003), e parece ser necessário para que ocorra a adequada maturação, tanto nuclear quanto citoplasmática.

A diminuição da taxa de maturação nuclear que apresentaram os oócitos submetidos à BSA durante a MIV já foi descrita anteriormente (ALI *et al.*, 2002) e pode ser explicada pelo efeito que os ácidos graxos tem sobre a mesma. Os lipídeos tem um papel importante durante a maturação nuclear, estando demonstrada a relação entre a β -oxidação e a reativação da meiose (DOWNS *et al.*, 2009 e DUNNING *et al.*, 2010). É mediante ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) que acontece a quebra da vesícula germinativa e a reativação da meiose (CHEN *et al.*, 2006). De acordo com Downs *et al.* (2009) a acetil-CoA

carboxilase (ACC) é a principal responsável pela ativação da MAPK. Apesar de ser a oxidação dos ácidos graxos uma das maiores consequências da ativação da MAPK, pela diminuição dos níveis do malonil-CoA, estudos demonstraram que a inibição da oxidação dos lipídeos impede, por sua vez, a reativação da meiose (DOWNS *et al.*, 2009 e DUNNING *et al.*, 2010). Desse modo, considerando que, segundo o fabricante, a BSA é praticamente isento de ácidos graxos, seria lógico obter uma diminuição da maturação nuclear nos oócitos submetidos a este composto.

Uma adequada β -oxidação depende de vários fatores, entre eles, da quantidade e localização lipídica e mitocondrial, da funcionalidade das mitocôndrias e de todos os fatores celulares que interferem nesse metabolismo.

Em murinos, Dunning *et al* (2010) estudaram a β -oxidação durante a MIV em meios suplementados com SFB e BSA. Os autores observaram que apenas no grupo com SFB ocorria aumento dos níveis de oxidação no decorrer da maturação. Indicaram como provável causa desse efeito a presença de L-carnitina no SFB e ausência da mesma na BSA. Em ambos os casos, tanto nos oócitos maturados em BSA como nos maturados em SFB, a adição de L-carnitina aumentou a oxidação lipídica, e melhorou o desenvolvimento embrionário. O estudo verificou que a BSA impede uma oxidação satisfatória na MIV e que mesmo que o SFB a permita, esta ainda poderia ser melhorada.

Na célula, a oxidação de um mol de glicose produz de 27 a 31 mols de ATP. No entanto, a oxidação de um mol de ácido palmítico fornece 104 mols de ATP (Revisado por STURMEY *et al.*, 2009), demonstrando que a oxidação de ácidos graxos é a principal fonte de energia na célula.

Sabendo-se que não há formação de novas organelas até a fase de blastocisto (EBERT *et al.*, 1988), as mitocôndrias oocitárias são responsáveis pelo aporte energético do embrião até essa fase (VAN BLERKOM, 2011). Por isso é de extrema importância que durante a MIV ocorra maturação mitocondrial e lipídica adequada. Essa maturação compete, como mencionado anteriormente, além da migração sincrônica das organelas, uma quantidade equilibrada das mesmas. De acordo com nosso conhecimento, esse trabalho foi o primeiro a estudar o comportamento lipídico-mitocondrial durante a MIV de oócitos bovinos, avaliando o efeito da suplementação com SFB e /ou BSA.

Sobre a redistribuição das mitocôndrias e gotas lipídicas, nos oócitos imaturos a localização principal das duas organelas foi periférica, conforme descrito na maioria dos estudos em bovinos (HYTTEL *et al.*, 1986, STOJKOVIC *et al.*, 2001 e ADONA *et al.*, 2008). Entretanto, os resultados encontrados após a maturação, tanto *in vivo* como *in vitro*, diferem de relatos prévios em alguns aspectos.

Na maturação *in vivo*, comparando-se oócitos em MII com oócitos imaturos, percebe-se uma grande diferença na migração lipídica, sem alterações na distribuição mitocondrial. A totalidade dos oócitos maduros nuclearmente apresentou gotas lipídicas dispersas, sendo que apenas metade desses oócitos também apresentou essa migração mitocondrial. Demonstrou-se assim, que mesmo em oócitos maturados *in vivo*, houve assincronia entre a migração de mitocôndrias e lipídeos em parte desses oócitos, ao contrário de alguns relatos anteriores (KRUIP *et al.*, 1983 e HYTTEL *et al.*, 1986), em que se observou, mediante microscopia eletrônica, que durante a maturação *in vivo* as organelas migraram conjuntamente desde a periferia até uma localização homogênea dentro do citoplasma. Da mesma forma, oócitos maturados *in vitro* apresentaram maior assincronia na migração das organelas, podendo indicar um dos problemas não só para a maturação oocitária, mas também para o desenvolvimento embrionário, pois essa distância física entre as organelas provavelmente provoca uma deficiência na β -oxidação.

Com relação à migração mitocondrial bovina durante a MIV, os dados encontrados neste estudo diferem dos relatados recentemente por Adona et al (2008), em que praticamente a totalidade dos oócitos apresentava mitocôndrias dispersas após a MIV. Como os autores realizaram avaliação por microscopia de epifluorescência, é provável que a técnica de microscopia utilizada tenha contribuído para as referidas diferenças, já que a microscopia confocal permite uma avaliação mais precisa.

Pesquisas na PIVE apontam para o uso do SFB como causa do acúmulo lipídico, mostrando que há efeitos do mesmo já durante a MIV (FERGUSON E LEESE, 1999, KIM *et al.*, 2001 e ABE *et al.*, 2002). De fato, no presente trabalho houve acúmulo lipídico durante a MIV em todos os grupos, sendo esse acúmulo mais acentuado no grupo com maiores concentrações de SFB. Porém, não foi

constatado acúmulo lipídico nos oócitos maturados *in vivo*, que por sua vez, mantiveram a mesma quantidade lipídica que nos oócitos imaturos.

Ainda existem controvérsias sobre o comportamento dos lipídeos durante a MIV nas diferentes espécies, estando relatado, por exemplo, diminuição do acúmulo na espécie suína (ROMEK *et al.*, 2010) e aumento na murina (YANG *et al.*, 2010). Em bovinos, embora estudos mais antigos mostrassem uma diminuição dos TG citoplasmáticos no decorrer da MIV (FERGUSSON e LEESE, 1999 e KIM *et al.*, 2001), a espectrometria de massas provou que há aumento desses lipídeos nos oócitos após a maturação *in vitro* (FERREIRA *et al.*, 2009b). Esses últimos dados estão de acordo com os achados do presente estudo, em que foi observado acúmulo lipídico durante a MIV independentemente da suplementação recebida.

Porém, esse aumento não foi verificado em oócitos maturados *in vivo*, mostrando assim que, além da suplementação proteica, há outros fatores fisiológicos que podem afetar esse ponto do metabolismo. A ausência do acúmulo lipídico nos oócitos maturados *in vivo* poderia ser explicada pela possível síntese de lipídeos concomitante a sua metabolização na via β -oxidação. Como no presente trabalho oócitos maturados *in vivo* foram os únicos que mostraram correlação entre quantidade lipídica e mitocôndrias ativas, isso pode indicar uma adequada β -oxidação celular nesses oócitos e uma deficiência nos oócitos maturados *in vitro*.

A BSA na MIV provocou uma diminuição do acúmulo lipídico e um aumento de mitocôndrias ativas. Tendo em consideração a suposta falta de L-carnitina na BSA (Dunning *et al.*, 2010) e a assincronia na migração das organelas durante a MIV, pode-se presumir que tenha ocorrido uma deficiência na β -oxidação desses oócitos, a despeito da quantidade suficiente de mitocôndrias ativas. Embora a BSA seja praticamente ausente de ácidos graxos, acredita-se que o déficit na β -oxidação seja de fato o responsável pelo acúmulo lipídico verificado nesse grupo. Ainda, essa falha na β -oxidação poderia ter provocado, além da diminuição das taxas de maturação, o menor desenvolvimento embrionário observado nesse grupo, pois a falta de energia pode levar à apoptose celular e parada do desenvolvimento (VAN BLERKOM, 2011).

O SFB provocou além de aumento lipídico, diminuição das mitocôndrias ativas citoplasmáticas comparado com os oócitos submetido à BSA durante a MIV.

Oócitos expostos a uma maior quantidade de SFB apresentaram maior acúmulo lipídico comparado àqueles expostos à BSA, dados que estão de acordo com estudo prévio (FERGUSON E LEESE, 1999). Mesmo parecendo ser o SFB um composto que permite níveis razoáveis de β -oxidação quando comparado à BSA (DUNNING *et al.*, 2010), sabe-se que esse composto provoca danos na membrana mitocondrial. A amônia gerada a partir dos substratos do SFB parece ser a causa desse dano (RUSSELL *et al.*, 2006), podendo provocar a diminuição no número de mitocôndrias ativas, fato observado neste trabalho.

Assim, o maior acúmulo lipídico observado no grupo suplementado com 10% de SFB pode ter sido influenciado por dois fatores. Primeiramente, sendo o soro um composto rico em ácidos graxos, e sabendo-se da capacidade dos mesmos de serem transportados até o citoplasma oocitário, seria esperado o aumento de lipídeos nesses oócitos. Ademais, soma-se o fato de que o SFB, mesmo levando a uma maior sincronia na migração das organelas e aparentemente possuindo níveis razoáveis de L-carnitina, provoca danos na membrana mitocondrial, podendo prejudicar a oxidação lipídica. Assim, o oócito poderia não ser capaz de metabolizar todos os lipídeos citoplasmáticos, levando ao mencionado acúmulo.

Mesmo parecendo ser o SFB imprescindível na migração das organelas durante a MIV por proporcionar adequada migração dos GC e maior taxa de oócitos com mitocôndrias dispersas no citoplasma, esse composto não conseguiu atingir as mesmas taxas de migração mitocondrial encontradas nos oócitos maturados *in vivo*. No entanto, o uso do SFB possibilita a obtenção de taxas de maturação nuclear e desenvolvimento embrionário razoáveis na PIVE. Portanto, oócitos maturados com SFB conseguem taxas razoáveis na PIV, embora ainda apresentem diferenças frente aos oócitos maturados *in vivo* em relação à migração e quantidade de mitocôndrias e lipídeos.

Oócitos que foram expostos à BSA e 5 % de SFB mostraram uma tendência a maior atividade mitocondrial e ao menor acúmulo lipídico, provavelmente pela presença de uma menor concentração do soro, entretanto, não foram observadas melhores taxas de maturação e de desenvolvimento quando comparou-se ao grupo com 10% de SFB na MIV. Além disso, esse grupo apresentou baixa taxa de sincronia entre as organelas, apesar do alto número de oócitos com lipídeos

dispersos e mitocôndrias em transição. Oócitos que não completam a migração mitocondrial, mas encontram-se em transição, talvez sejam capazes de manter níveis de β -oxidação razoáveis para atingir boas taxas de desenvolvimento. Comprova-se que a concentração de apenas 5% de SFB já causa efeitos sobre o comportamento lipídico-mitocondrial.

Em relação ao acúmulo lipídico embrionário, embora existam relatos de maior acúmulo após suplementação da MIV com SFB (FERGUSON E LEESE, 1999 e ABE *et al.*, 2002) não observamos esse efeito neste trabalho. Verificamos apenas um menor acúmulo lipídico nos oócitos maturados com BSA. Porém, conforme já mencionado, acreditamos que esses oócitos apresentam menores níveis de β -oxidação. Esse fato, associado ao menor acúmulo de lipídeos presente nessas estruturas, poderia levar a um menor fornecimento energético na fase de desenvolvimento pré-implantacional, limitando além das taxas de produção, a qualidade dos embriões obtidos. Desse modo, como o uso de SFB durante a MIV fornece mais lipídeos oocitários, a fonte energética desses embriões durante o CIV estaria assegurada, refletindo-se possivelmente no desenvolvimento de embriões de qualidade superior no lugar de um acúmulo lipídico embrionário.

Além disso, percebeu-se neste estudo que o maior acúmulo lipídico acontece na etapa de CIV, corroborando com relatos de Ferguson e Leese (1999). É esperado que no decorrer do desenvolvimento embrionário ocorra síntese de lipídeos para obtenção da energia necessária para o desenvolvimento embrionário, porém, espera-se também maior β -oxidação. Assim, o acúmulo lipídico observado poderia ser fisiológico, ou ainda uma consequência da deficiência na oxidação, além da possibilidade de ser um efeito consequente ao sistema de PIVE.

Com relação ao tamanho das gotas lipídicas, neste trabalho não foram observadas diferenças entre os oócitos imaturos e maturados *in vitro* ou *in vivo*. Porém, verificou-se um aumento na porcentagem de gotas maiores que 2 μ m de diâmetro nos embriões produzidos, independentemente do grupo, mostrando-se que além do aumento na quantidade lipídica, também há um aumento no tamanho das gotas ao longo da PIVE. No entanto, constataram-se diferença no tamanho das gotas embrionárias, sendo que os embriões subsequentes à MIV com SFB apresentaram maior porcentagem de gotas entre 2-6 μ m que os embriões do GB+S.

Esses dados contradizem os achados por Abe et al (2002) onde os embriões oriundos da MIV com SFB obtiveram maior porcentagem de gotas gigantes (> de 6 μm) em comparação ao uso da BSA na MIV. Esses dados demonstram a necessidade de maiores estudos sobre a dinâmica das gotas lipídicas na PIVE.

Portanto, seria de extrema importância fazer a comparação da produção *in vivo* e *in vitro* de embriões, para elucidar, dentre outras coisas, os acontecimentos no metabolismo lipídico e na β -oxidação ao longo desse processo.

Com o intuito de aprofundar no estudo dos efeitos dos suplementos proteicos na MIV sobre o acúmulo lipídico, foram estudados dois genes envolvidos na síntese de TG e gotas lipídicas, o *DGAT2* e *PLIN2*. Ambos os genes foram identificados em todas as estruturas estudadas: células do *cumulus*, oócitos desnudos imaturos e maduros *in vitro*, e nos subsequentes embriões.

Acredita-se que o gene *PLIN2* tenha sido identificado previamente somente em células da granulosa de primatas (SEACHORD *et al.*, 2005), em oócitos de camundongos (YANG *et al.*, 2010) e recentemente em oócitos bovinos (AARDEMA *et al.*, 2011), sem haver relatos sobre a expressão desse gene durante a MIV e em embriões de qualquer espécie. Ainda, este foi o primeiro estudo a detectar a expressão do gene *DGAT2* em células ovarianas (células do *cumulus* e oócitos) e em embriões.

Ambas as proteínas, *PLIN2* e *DGAT2*, estão envolvidas no metabolismo lipídico. A *DGAT2* é a enzima responsável pela síntese de TG e a *PLIN2* inibe a interação entre lipídeos e lipases e encontra-se relacionada com o número e tamanho das gotas lipídicas (revisado por BICKEL *et al.*, 2009).

Na avaliação das células do *cumulus*, houve um aumento na expressão do gene *PLIN2* e uma diminuição da *DGAT2* no decorrer da MIV, sem diferenças entre os grupos. Ambos os dados sugerem aumento da síntese lipídica. No caso do gene *PLIN2*, a expressão pode ter aumentado frente a maior demanda proteica, e no caso do *DGAT2* a diminuição do RNAm pode ter ocorrido em decorrência a uma maior tradução à proteína, por elevada demanda. No entanto, para maiores esclarecimentos desse processo, seria preciso fazer estudos imunológicos do comportamento dessas proteínas ao longo da PIVE.

Esse aumento lipídico nas células do *cumulus* pode ter diversas funções. Além do fornecimento energético e do possível transporte de lipídeos até o citoplasma oocitário, os lipídeos são fundamentais para a síntese de hormônios esteróides. Sabe-se que nas células esteroideogênicas, as gotas lipídicas são transportadas até as mitocôndrias, onde esses lipídeos entram na via da síntese desses hormônios (ALMAHBOBI *et al.*, 1993). Como os hormônios esteróides são imprescindíveis no decorrer da maturação, é coerente que no presente estudo tenha ocorrido esse aumento lipídico nas células do *cumulus*.

Acredita-se que a diminuição da expressão do gene *DGAT2* esteja relacionada com o processo de tradução, pois além da diminuição nas células do *cumulus*, os oócitos expostos ao SFB também apresentaram diminuição significativa na expressão desse gene. Uma vez que esses oócitos obtiveram maior acúmulo lipídico, seria razoável pensar numa maior tradução para aumento da síntese de TG.

No estudo realizado por Yang *et al.* (2010) em COCs murinos, além do aumento lipídico, houve aumento na expressão do gene e da proteína *PLIN2* ao longo da maturação *in vivo*. Porém, quando COCs imaturos e maduros *in vivo* foram comparados com os oócitos maturados *in vitro*, percebeu-se que, apesar do acúmulo lipídico, não houve diferença na expressão do gene *PLIN2* entre os COCs imaturos e os maduros *in vitro*. Esses últimos resultados não condizem aos achados do presente trabalho, em que se observou aumento da expressão do gene nas células do *cumulus* ao longo da MIV. Embora em nosso estudo as células do *cumulus* tenham sido estudadas separadamente dos oócitos desnudos, acredita-se que os COCs teoricamente deveriam manter esse aumento na expressão do *PLIN2*.

Por outro lado, os animais utilizados na pesquisa realizada por Yang *et al.* (2010) sofreram tratamento hormonal para obtenção de todos os oócitos, tanto imaturos (parte deles destinados à MIV), quanto dos maduros *in vivo*. Market-Velker *et al.* (2009) relataram alteração do padrão de expressão gênica nos oócitos provenientes de fêmeas que sofreram tratamentos hormonais, dificultando a compreensão da origem dessas diferenças, ou seja, se as mesmas ocorreram por efeito do tratamento hormonal dos animais ou pela maturação.

No presente trabalho, a suplementação proteica durante a MIV não influenciou na expressão embrionária dos genes envolvidos na síntese lipídica. Esse

dado está de acordo com o achado da ausência de diferença na quantidade lipídica presente nos blastocistos obtidos após os tratamentos. Os resultados da expressão dos genes *PLIN2* e *DGAT2* reforçam os resultados verificados na quantificação lipídica, acreditando-se que os suplementos utilizados tenham afetado exclusivamente o acúmulo lipídico oocitário. Ademais, demonstrou-se que ambos os genes podem estar relacionados ao aumento do metabolismo lipídico.

Por fim, demonstramos neste estudo que a BSA parece não ser a candidata ideal para substituição do SFB, pois a mesma não foi capaz de proporcionar boas taxas de maturação e desenvolvimento embrionário. Além disso, mesmo diminuindo o acúmulo lipídico oocitário, a BSA na MIV não provocou menor quantidade lipídica nos blastocistos em comparação aos embriões do grupo com SFB.

Tentar melhorar a oxidação dos lipídeos acumulados poderia ser uma estratégia para melhorar a PIVE, mas também poderia ter repercussões negativas a nível celular. Deve-se considerar que mesmo o oócito tendo uma capacidade adaptativa aos compostos ROS (FERREIRA *et al.*, 2009a) uma excessiva β -oxidação produziria uma quantidade maior dessas substâncias, que por sua vez, poderiam provocar danos mitocondriais (revisado por MCKEEGAN e SUTMEY, 2012), levando à necessidade do uso de antioxidantes. A L-carnitina poderia ter grande contribuição nessa questão, pois além de melhorar a oxidação aumentando o transporte dos ácidos graxos até a mitocôndria, também tem função antioxidante, o que poderia evitar danos à membrana mitocondrial.

8. CONCLUSÕES

- O SFB, tendo níveis lipídicos altamente superiores à BSA-FAF, proporciona ao oócito um ambiente com perfil de ácidos graxos diferente ao do fluido folicular.
- A MIV apresenta diferenças em comparação à maturação *in vivo* com relação à distribuição e quantificação mitocondrial e lipídica, sendo que apenas no

processo *in vivo* é mantida a correlação entre quantidade de mitocôndrias ativas e lipídeos.

- A MIV provoca aumento lipídico oocitário que não ocorre nos oócitos maturados *in vivo*.
- A suplementação proteica durante a MIV tem efeito sobre o acúmulo lipídico oocitário, porém, não sobre o acúmulo lipídico embrionário.
- Oócitos maturados com BSA possuem menor acúmulo lipídico, entretanto, não são capazes de alcançar taxas de maturação citoplasmáticas e de blastocistos proporcionadas pelo SFB.
- O SFB permite boas taxas de maturação e desenvolvimento embrionário, porém, oócitos maturados em meio contendo este composto apresentam diferenças frente aos maturados *in vivo* em relação à distribuição e/ou quantificação de lipídeos e mitocôndrias.
- Embora a redução da concentração do SFB pela metade durante a MIV permita a obtenção de taxas satisfatórias de maturação e de desenvolvimento embrionário, não há atenuação dos efeitos negativos do soro sobre as mitocôndrias e lipídeos oocitários.
- Os genes *PLIN2* e *DGAT2* estão expressos em oócitos e embriões bovinos estando provavelmente associados ao aumento do metabolismo lipídico.

9. REFERENCIAS

AARDEMA, H., VOS, P. L. A. M., LOLICATO, F., ROELEN, B. A. J., KNIJN, H. M., VAANDRAGER, A. B., HELMS, J. B., AND GADELLA, B. M. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v.85, p62-69, 2011.

ABE, H., YAMASHITA, S., ITOH, T., SATOH, T., HOSHI, H. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro* matured and fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum free medium or in serum supplemented medium. **Molecular Reproduction and Development**, v.53, p.325-335, 1999.

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 and Development**, v.61, p.57-66, 2002.

ABE H., HOSHI, H., Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. **Journal of Reproduction and Development**, v.49, p.193–202, 2003.

ADAMIAK, S. J., POWELL, K., ROOKE, J. A., WEBB, R., AND SINCLAIR, K. D. Body composition, dietary carbohydrates and fatty acids determine post-fertilisation development of bovine oocytes in vitro. **Reproduction**, v.131, p.247–258, 2006.

ADONA, P.R., PIRES, P.R.L., QUETGLAS, M.D., SCHWARZ, K.R.L., LEAL, C.L.V. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Animal Reproduction Science**, v.108, p.48-65, 2008.

ALI, A., SIRARD, MA. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocyte during in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, v.66, p.901–905, 2002.

ALMAHBOBI, G., WILLIAMS, L.J., HAN, X.G. AND HALL, P.F. Binding of lipid droplets and mitochondria to intermediate filaments in rat Leyding cells. **Journal of Reproduction and fertility**, v.98, p209–217, 1993.

AMBRUOSI, B., LACALANDRA, G.M., IORGA, A.I., DE SANTIS, T., MUGNIER, S., MATARRESE, R., GOUDET, G., DELL'AQUILA, M.E. Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: Implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. **Theriogenology**, v.71, p.1093-1104, 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. **Official Methods of Analysis**, Arlington, Official Method. N.996.06, cap. 41, p.20-24A, 2000.

AVELINO, K. B. ***Estimulação e inibição da síntese de glutatona em oócitos bovinos: efeitos sobre a maturação e desenvolvimento embrionário in vitro***. 2004. 92 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2004.

BARCELÓ-FIMBRES, M., SEIDEL, G.E. Cross-validation of techniques for measuring lipid content of bovine oocytes and blastocysts. **Theriogenology**, v.75, p.434-444, 2011

BARTZ, R., ZEHMER, J.K., ZHU, M., CHEN, Y., SERRERO, G., ZHAO. Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. **Journal of Proteome Research**, v.8, p.3256-2365, 2007

BELLER, M., THIEL, K. THUL, P.J., JÄCKLE, H. Lipid droplets: A dynamic organelle moves into focus. **FEBS Letters**, v.584, p.2176-2182, 2010

BICKEL, P.E., TANSEY, J.T., WELTE, M.A. PAT Proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1791, p.419-440, 2009.

BOSTROM, P., ANDERSSON, L., RUTBERG, M., PERMAN, J., LIDBERG, U., JOHANSSON, B.R., FERNANDEZ-RODRIGUEZ, J., ERICSON, J., NILSSON, T., BOREN, J., OLOFSSON, S.O. SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. **Nature Cell Biology**, v.9, p.1286-1293, 2007.

BOUSQUET, D., TWAGIRAMUNGU, H., MORIN, N., BRISSON, G., CARBONEAU, G., DUROCHERS, J. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. **Theriogenology**, v.51, p.59-70, 1999.

BRACKETT, B.G., BOUSQUET, D., BOIC, M.L, DONAWICK, W.J, EVANS, J.F., DRESSEL, M.A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v.27, p.147-158, 1982.

BROWN, D.A. Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. **Current Biology**, v.11, p.446-449, 2001.

CHEN, J., HUDSON, E., CHI, M.M., CHANG, A.S., MOLEY, K.H., HARDIE, D.G., DOWNS, S.M. AMPK regulation of mouse oocyte meiotic resumption in vitro. **Developmental Biology**, v.291, p.227–238, 2006.

CHERR G. N., DROBNIS E. Z., KATZ D. F. Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. **The Journal of Experimental Zoology**, v.246, p.81-93, 1988.

CUMMINS, J.M. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v.115, p.23-29, 2004.

DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.234, p.19-25, 2005.

DOWNS, S. M., MOSEY, J. L., AND KLINGER, J. (2009). Fatty acid oxidation and meiotic resumption in mouse oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.76, p.844–853, 2009.

DUNNING, K. R., CASHMAN, K., RUSSELL, D. L., THOMPSON, J. G., NORMAN, R. J., AND ROBKER, R. L. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. **Biology and Reproduction**, v.83, p.909–918, 2010.

DUCIBELLA, T., TANGARAJAN, S., ANDERSON, E. The development of mouse oocyte cortical reaction competence is accompanied by major changes in cortical vesicles and not cortical granule depth. **Developmental Biology**, v.130, p.789-792, 1988.

DUVNJAK, M., LEROTI, I., BARSIC, N., TOMASIC, V., VIROVIC JUKIC, L., VELAGIC, V. Pathogenesis and management issues for nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal os Gastroenterology**, v.13, p.4539-4550, 2007.

EBERT, K.M., LIEM, H. E., HECHT, N. B. Mitochondrial DNA in the mouse preimplantation embryo. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.82, p.145–149, 1988.

ECKERT, J., NIEMANN, H. In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. **Theriogenology**, v.43, p.1211–1225, 1995

FERGUSON, E.M., LEESE, H.J. Tryglyceride content of bovine oocyte and early embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.116, p.373-378, 1999.

FERREIRA, E.M., VIREQUE, A.A., ADONA, P.R., MEIRELLES, F.V., FERRIANI, R.A., NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental. **Theriogenology**, v.71, p836-848. 2009a.

FERREIRA, C. R., SARAIVA, S.A., CATHARINO, R.R., GARCIA, J.S., GOZZO, F.C., SANVIDO, G.B., SANTOS, L.F.A., LO TURCO, E.G., PONTES, J.H.F., BASSO, A.C., BERTOLLA, R.P., SARTORI, R., GUARDIEIRO, M. M., PERECIN, F., MEIRELLES, F.V., SANGALLI, J.R., EBERLIN, M.N. Princípios e aplicações da espectrometria de massas em produção animal. In: II SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA À PRODUÇÃO ANIMAL. **Anais do II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal** São Carlos, SP, p.109-136, 2009b.

FERREIRA, C. R., SARAIVA, S.A., CATHARINO, R.R., GARCIA, J.S., GOZZO, F.C., SANVIDO, G.B., SANTOS, L.F.A., LO TURCO, E.G., PONTES, J.H.F., 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. **Journal of Lipid Research**, v.51, p.1218-1227, 2010

GÓMEZ E., RODRIGUEZ A., MUÑOZ M., CAAMAÑO J. N., HIDALGO C.O., MORÁN E., FACAL N., DIEZ 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, BARRETA, M. H., SANDRI, L. R., FERREIRA, R. ANTONIAZZI, A. Q. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.212-217, 2007.

GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. **Maturing the bovine oocyte**. 2.ed. Cambridge University Press, 2003, cap.4, p. 112- 157.

HYTTEL, P., CALLESEN, H., GREVE, T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.76, p.645-656, 1986

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

JUNGHEIM, E. S., LOUDEN, E. D., CHI, M. M.-Y., FROLOVA, A. I., RILEY, J. K., MOLEY, K. H. Preimplantation exposure of mouse embryos to palmitic acid results in fetal growth restriction followed by catch-up growth in the offspring. **Biology of Reproduction**, v.85, p.678-683, 2011.

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

KIMMEL, A.R., BRASAEMLE, D.L., MCANDREWS-HILL, M., SZTALRYD, C., LONDOS, C. Adoption of perilipin as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. **Journal of Lipid Research**, p.468-471, 2012.

KORHONEN, K., KANANEN, K., KETOJA, E., MATOMA, J., HALMEKYTO, M., PEIPPO, J. Effect of serum free in vitro maturation of bovine oocyte on subsequent embryo development and cell allocation in two developmental stages of day 7 blastocysts. **Reproduction of Domestic Animal**, v.45, p.42-49, 2010.

KRISHER, R.L.; BAVISTER, B.D. Enhanced glycolysis after maturation of bovine oocytes *in vitro* is associated with increased developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, v.53, p.19-26, 1999.

KRUIP, T.A.M., CRAN, D.G., VAN BENEDEN, T.H., DIELEMAN, S.J. Structural in bovine oocytes during final maturation in vivo. **Gamete Research**, v.8, p.29-47, 1983.

KUERSCHNER, L., MOESSINGER, C., THIELE, C. Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. **Traffic**, v.9, p.338-352, 2009.

LAPA, M., MARQUES, C.C., ALVES, S.P., VASQUES, M.I., BAPTISTA, M.C., CARVALHAIS, I., SILVA PEREIRA, M., HORTA, A.E.M., BESSA, R.J.B., PEREIRA, R.M. Effect of *trans*-10 *cis*-12 conjugated linoleic acid on bovine oocyte competence and fatty acid composition. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.904-910, 2011.

LEHNINGER. Princípios de Bioquímica. In: NELSON, D.L E COX, M.M. **Biosíntese dos Lipídeos**. 3.ed. .New York, 2002 cap.21, p. 599-638.

LEIBFRIED-RUTLEDGE M.L., CRITSER E.S., EYESTONE W.H., NORTHEY D.L., FIRST N.L. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v.36, p.376-383, 1987.

LEROY, J. L. M. R., GENICOT, G., DONNAY, I., AND VAN SOOM, A. Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with Nile red: a practical approach. **Reproduction in Domestic Animals**, v.40, p.76–78, 2005a.

LEROY, J. L. M. R., VANHOLDER, T., MATEUSEN, B., CHRISTOPHE, A., OPSOMER, G., DE KRUIF, A., GENICOT, G., AND VAN SOOM, A. (2005b). Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. **Reproduction**, v.130, p.485–495, 2005b.

LONDOS, C., BRASAEMLE, D.L., GRUIA-GRAY, J., SERVETNICK, D.S., SCHULTZ, C.J., LEVIN, D.M., KIMMEL, A.R. Perilipin: unique proteins with intracellular neutral lipid droplet in adipocytes and steroidogenic cells. **Biochemical Society Transactions**, v.23, p.611-615, 1995.

LONERGAN, P., FAIR, T., CORCORAN, D., EVANS, A.C. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, 65:137–152, 2006.

MACHATKOVA, M., JESETA, M., HULINSKA, P., KNITLOVA, D., NEMCOVA, L., KANKA, J. Characteristics of Bovine Oocytes with Different Meiotic Competence in Terms of Their Mitochondrial Status and Expression of Nuclear-Encoded Factors. **Reproduction in Domestic Animal**, v.47, p. 806-814, 2011.

MACHATY, Z., PEIPPO, J., PETER, S. Production and manipulation of bovine embryo: techniques and terminology. **Theriogenology**, v.78, p.937-950, 2012.

MARCHESAN, D., RUTBERG, M., ANDERSSON, L., ASP, L., LARSSON, T., BOREN, J., JOHANSSON, B.R., OLOFSSON, S.O. Aphospholipase D-dependent process forms lipid droplets containing caveolin, adipocyte differentiation-related protein, and vimentin in a cell-free system. **Journal of Biology and Chemistry**, v.278, p.27293-27300, 2003.

MAREI, W.F., WATHES, D.C., E FOULADI-NASHTA, A.A. The effect of linolenic acid on bovine oocyte maturation and development. **Biology of Reproduction**, v.81, p.1064–1072, 2010.

MARKET-VELKER, B.A., ZHANG, L., MAGRI, L.S., BONVISSUTO, A.C., MANN, M.R.W. Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. **Human Molecular Genetics**, v.19, p.36-51. 2010.

MARTIN, S., PARTON, R.G. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.7, p.373-378, 2006.

MARQUES, C.M., BAPTISTA, M.C., VASQUES, M.I., HORTA, A.E.M., PEREIRA, R.M. effect of polyunsaturated fatty acid (PUFA) on bovine oocyte in *vitro* maturation and subsequent embryo development and freezability. **Reproduction in Domestic Animal**, v.109, p.116, 2007.

MCKEEGAN, P.L., STURMEY, R.G. The role of fatty acids in oocyte and early embryo development. **Reproduction Fertility and Development**, v.24, p.59-67, 2012.

OLOFSSON, S.O., BOSTRÖM, P., ANDERSSON, L., RUTBERG, M., PERMAN, J., BORÉN, J. Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1791, p.448-458, 2009.

PINGUS, G., ENZMANN, E.V. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. I. the activation of ovarian eggs. **The Journal of Experimental Medicine**, v.62, p.655-675, 1935.

RÄTY M., KETOJA E., PITKÄNEN T., AHOLA V., KANANEN K., PEIPPO J. In vitro maturation supplements affect developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes and embryo quality after vitrification. **Cryobiology**, v.63, p.245-255, 2011.

RIZOS, D., FAIR, T., PAPADOPUOLOS, S., BOLAND, M., LONERGAN, P. Developmental, quality and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.62, p.320-327, 2002.

RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., PEREZ-GARNELO, S., DE LA FUENTE, J., BOLAND, M.P., LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance and Messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, v.68, p.:236-243,2003.

ROMEK, M., GAJDA, B., KRZYSZTOFOWICZ, E., KEPCZYNSKI, M., SMORAG, Z. New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and pre-implantation embryos using Nile Red fluorescent probe. **Theriogenology**, v.75, p.42-54, 2010.

ROMEK, M., GADJA, B., ROLKA, M., SMORA, Z. Mitochondrial activity and morphology in developing porcine oocytes and pre-implantation non-cultured and cultured embryos. **Reproduction of Domestic Animals**, v.46, p.471-480, 2011.

RUDERMAN, N.B., SAHA, A.K., KRAEGEN, E.W.. Minireview: Malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity. **Endocrinology**, v.144, p.5166–5517, 2003.

RUSSELL, 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.

SATA, R., TSUJII, H., ABE, H., YAMASHITA, S., HOSHI, H. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic development. **Journal of Reproduction and Development**, v.45, p.97-103, 1999.

SEACHORD, C. L., VANDEVOORT, C. A., AND DUFFY, D. M. Adipose differentiation-related protein: a gonadotropin- and prostaglandinregulated protein in primate periovulatory follicles. **Biology of Reproduction**, v.72, p.1305–1314, 2005.

SHEHAB-EL-DEEN, M.A., LEROY, J.L.M.R., MAES, D., VAN SOOM, A. Cryotolerance of bovine blastocysts is affected by oocyte maturation in media containing palmitic or stearic acid. **Reproduction in Domestic Animal**, v.44, p.140-144, 2009.

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

STURMEY, R.G., O'TOOLE, P.J., LEESE, H. J. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial:lipid association in the porcine oocyte. **Reproduction**, v.6, p.829-837, 2006.

STURMEY, R. G. REIS, A., LEESE, H. J., AND MCEVOY, T. G. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reproduction in Domestic Animal**, v.44 (Suppl 3), p.50–58, 2009.

SUN, Q.Y., WU, G.M., LAI, L., PARK, K.W., CABOT, R., CHEONG, H.T., DAY, B.N., PRATHER, R.S., SCHATTEN, H. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. **Reproduction**, v.122, p.155–163, 2001.

TARAZONA, A.M., RODRIGUEZ, J.I., RESTREPO, L.F., OLIVERA-ANGEL, M. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro*. **Reproduction of domestic Animals**, v.41, p.5-11, 2006.

TSAADON, A., ELIYAHU, E., SHTRAIZENT, N., SHALGI, R. When a sperm meets an egg: Block to polyspermy. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.252, p.107-114, 2006.

VALEE, M., ROBERT, C., METHOT, S., PALIN, M.F., SIRAD, M.A. Cross species hybridisations on a multi-species cDNA microarray to identify evolutionary conserved genes expressed in oocytes. **BMC Genomics**, v.7, p.113-127, 2006.

VAN BLERKOM, J E RUNNER, M.N. Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mouse oocyte. **American Journal of Anatomy**, v.171, p.335–355, 1984.

VAN BLERKOM, J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. **Mitochondrion**, v.11, p.797-813, 2011.

VANROOSE G., VANSOON A., DEKRUIF A. From co-culture to defined medium: State of the art and practical considerations. **Reproduction of Domestic Animals**, v.36, p.25-28, 2001.

WALTHER, T.C., FARESE JR, R.V. The life of lipid droplets. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1791, p.459-466, 2009.

WARZYCH, E., WRENZYCKI, C., PEIPO, J., LECHNIAK, D. Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produces *in vitro*. **Molecular Reproduction Development**, v.74, p.:280-289, 2007.

WOLINS, N.E., RUBIN, B., BRASAEMLE, D.L. TIP47 associates with lipid droplets. **Jounal of Biology and Chemistry**, v.276, p.5101-5108, 2001

WONG, J.L., WESSEL, G.M. Defending the zygote: search for the ancestral animal block to polyspermy. **Current Topics in Developmental Biology**, v.72, 2006.

WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo vitality. **Theriogenology** v.68, p.77-83, 2007.

YANG, X., DUNNING, K.R., WU, L.L-Y., HICKEY, T.E., NORMAN, R.J., RUSSEL, D.L., LIANG, X., ROBKER, R.L. Identification of Perilipin-2 as a lipid droplet protein regulated in oocytes during maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.1262-1271, 2010.