



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MATURAÇÃO NO ACÚMULO DE  
LIPÍDIOS EM OVÓCITOS BOVINOS**

**OTÁVIO AUGUSTO COSTA DE FARIA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF  
ABRIL DE 2020**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MATURAÇÃO NO ACÚMULO DE  
LIPÍDIOS EM OVÓCITOS BOVINOS**

**OTÁVIO AUGUSTO COSTA DE FARIA**

**ORIENTADOR: DRA. MARGOT ALVES NUNES DODE**

**BRASÍLIA/DF  
ABRIL DE 2020**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MATURAÇÃO NO ACÚMULO DE  
LIPÍDIOS EM OVÓCITOS BOVINOS**

**OTÁVIO AUGUSTO COSTA DE FARIA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA  
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
ANIMAIS, COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS Á OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

**APROVADA POR:**

---

**MARGOT ALVES NUNES DODE, PhD (EMBRAPA-CENARGEN)  
(ORIENTADORA)**

---

**RODRIGO ARRUDA DE OLIVEIRA, PhD (UNB)  
(EXAMINADOR INTERNO)**

---

**MAITE DEL COLLADO BARRONDO, PhD (USP)  
(EXAMINADOR EXTERNO)**

---

**GIANE REGINA PALUDO, PhD (UNB)  
(SUPLENTE)**

**BRASÍLIA/DF, 14 de abril de 2020**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu filho, Valentim de Faria, a minha família e amigos, por sempre me apoiarem, em todas decisões.

À Dra. Margot Alves Nunes Dode, pelo exemplo profissional e pessoal.

À equipe de pesquisadores, alunos e funcionários do Centro Experimental Sucupira e LRA, pelo convívio e pela colaboração diária.

Ao apoio financeiro das instituições que fizeram parte destes anos do curso: Universidade de Brasília; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior); FAP-DF (Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal).

## ÍNDICE

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES .....	xii
CAPÍTULO 1 .....	1
1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 HIPÓTESE .....	4
1.2 OBJETIVOS.....	4
1.2.1 Geral.....	4
1.2.2 Específicos .....	4
1 REVISÃO LITERATURA .....	5
2.1. Ovogênese e Foliculogênese.....	5
2.2. Maturação ovocitária .....	7
2.3. Lipídios na maturação.....	10
2.3.1 Acúmulo de lipídios e seus efeitos .....	12
2.4 Avaliações de lipídios em ovócitos bovinos.....	14
3 REFERÊNCIAS .....	16
Capítulo 2 .....	28
RESUMO .....	29
ABSTRACT .....	31
INTRODUÇÃO .....	33
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	35
Experimento 1 - Avaliação da maturação nuclear de ovócitos bovinos submetidos à TIFOI (MatT) .....	35
Experimento 2. – Avaliação do Acúmulo de lipídios em ovócitos bovinos durante a maturação em diferentes sistemas. ....	36

MATERIAL E MÉTODOS.....	38
Animais.....	38
Obtenção de ovócitos Imaturos.....	38
Avaliação da maturação nuclear .....	39
Maturação in vitro (MatV).....	40
Maturação TIFOI (MatT).....	40
Maturação in vivo (MatS).....	41
Recuperação de ovócitos maturados .....	41
Coloração de Lipídios .....	42
PCR em tempo real (qPCR).....	42
Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	44
Análise estatística .....	44
RESULTADOS .....	45
Experimento 1 - Avaliação da maturação nuclear de ovócitos bovinos submetidos à TIFOI (MatT) .....	45
Experimento 2: Avaliação do acúmulo de lipídios em ovócitos bovinos durante a maturação em diferentes sistemas .....	46
Avaliação ultraestrutural de ovócitos bovinos maturados em diferentes sistemas .....	47
Avaliação de genes relacionados com metabolismo de lipídeos em ovócitos.....	50
DISCUSSÃO .....	51
CONCLUSÃO.....	55
REFÊRENCIAS .....	56

## RESUMO

Trabalhos recentes têm demonstrado que a maturação *in vitro* (MIV) acarreta um maior acúmulo de lipídios no ovócito, o que se reflete na qualidade dos embriões produzidos. Esse acúmulo pode ser devido a retirada prematura dos ovócitos dos folículos ou ao ambiente *in vitro* propriamente dito, já que não ocorre quando os ovócitos são maturados *in vivo*. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de três sistemas de maturação: *in vitro* (MatV), *in vivo* (MatS) e Transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI; MatT), no acúmulo de lipídios em ovócitos bovinos. Os ovócitos foram maturados, em seus respectivos sistemas de maturação, por vinte e duas horas e, apenas os ovócitos com a presença do corpúsculo polar foram utilizados para as análises. A presença e quantificação de lipídios foi realizada pela coloração com Bodipy 493/503 em Microscopia Confocal e por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Foi também avaliada a expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídios por PCR em tempo real (qPCR) (*Acyl-CoA Synthetase Short Chain Family Member 2*, ACSS2; *Fatty Acid Elongase 1*, ELOVL1; *Fatty Acid Binding Protein 3*, FABP3). Dados relativos à cinética de maturação nuclear, quantificação do acúmulo de gotas lipídicas e expressão gênica, foram analisados pelo teste Qui-quadrado, ANOVA (GLIMMIX) e Kruskal-Wallis, respectivamente. Para todas as análises um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) foi considerado. A média da área ocupada pelos lipídios nos ovócitos imaturos (IMA;  $13\% \pm 1,9$ ) foi similar ( $p > 0,05$ ) aos ovócitos maturados *in vivo* (MatS=  $16\% \pm 1,7$  e MatT=  $12\% \pm 1,9$ ). Entretanto, nos ovócitos maturados *in vitro* (MatV), houve um aumento no acúmulo de lipídios ( $24\% \pm 1,9$ ) durante a maturação sendo maior do que nos outros grupos ( $p < 0,001$ ). Na avaliação ultraestrutural os ovócitos MatV apresentaram uma maior presença de lipídios. Contudo, todos os grupos foram semelhantes quanto a organização dos grânulos corticais e mitocôndrias. A expressão dos genes ACSS2, ELOVL1 e FABP3 foram semelhantes entre os grupos MatT e MatS ( $p > 0,05$ ), contudo, os ovócitos MatS também foram semelhantes ( $p > 0,05$ ) aos MatV. Pela primeira vez, foi demonstrado que ovócitos maturados pela TIFOI são semelhantes aos ovócitos maturados *in vivo*, quanto ao acúmulo de lipídios, o que implica na superior qualidade quando comparado com os *in*

vitro. Este novo método de maturação abre novas possibilidades para as biotecnologias que necessitam da maturação de ovócitos como a PIVE, criopreservação de ovócitos e embriões, clonagem e transgenia.

Palavras chave: Lipídios; Maturação *in vitro*; Maturação *in vivo*; Ovócitos; TIFOI

## ABSTRACT

Recent studies have shown that in vitro maturation (IVM) causes a greater accumulation of lipids droplets in the oocyte, which will affect the lipids content of the future embryo. This accumulation can be due to the premature removal of the oocytes from their follicles or to the in vitro environment itself, since it does not occur when the oocytes are matured in vivo. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of three maturation systems: in vitro (MatV), in vivo (MatS) and Intrafollicular transfer of immature oocytes (IFIOT; MatT), on the accumulation of lipids droplets in bovine oocytes. Oocytes were matured in the different maturation systems for 22h and only oocytes presenting a polar body were used for the analyzes. The presence and quantification of lipids was performed by Confocal Microscopy (Bodipy 493/503) and Transmission Electron Microscopy (TEM). The expression of genes related to lipid metabolism (Acyl-CoA Synthetase Short Chain Family Member 2, ACSS2; Fatty Acid Elongase 1, ELOVL1; Fatty Acid Binding Protein 3, FABP3) was quantified by real-time PCR (qPCR). Data related to nuclear maturation kinetics, quantification of lipid droplets and gene expression, were analyzed using the Chi-square test, ANOVA (GLIMMIX) and Kruskal-Wallis, respectively. For all analyzes, a significance level of 5% ( $p < 0.05\%$ ) was considered. The area occupied by lipids droplets in immature oocytes (IMA=13%  $\pm$  1.9) was similar ( $p > 0.05\%$ ) to oocytes matured in vivo (MatS = 16%  $\pm$  1.7 and MatT = 12%  $\pm$  1.9). However, in oocytes matured in vitro (MatV), there was an increase in the accumulation of lipids droplets (24%  $\pm$  1.9), being higher than in the other groups ( $p < 0.001$ ). In the ultrastructural evaluations, MatV oocytes also showed the highest lipids content. However, all groups were similar in organization of cortical granules and mitochondria. The expression of ELOVL1 and FABP3 genes were similar between oocytes matured by superstimulation treatment (MatS) and IFIOT ( $p > 0.05\%$ ). However, transcripts level for ACSS2 gene was lower in IFIOT oocytes than in MatV oocytes, being the MatS oocytes similar to oocytes from both groups. For the first time, it was shown that oocytes matured by IFIOT are similar to those matured in vivo, regarding to lipid accumulation, which indicates better quality when

compared to the in vitro. This new maturation system opens up new possibilities for biotechnologies that require the maturation of oocytes such as IVF, cryopreservation of oocytes and embryos, cloning and transgenics.

Keywords: Lipids; in vitro Maturation; in vivo Maturation; Oocytes; IFIOT

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

**Figura 1.** Esquema mostrando a captação de piruvato e ácidos graxos em ovócito do fluido folicular ou do meio. Os ácidos graxos são armazenados em gotas lipídicas (LDs) ou absorvidos pelas mitocôndrias para a  $\beta$ -oxidação. O acúmulo de lipídios pode levar ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), causando estresse do retículo endoplasmático (RE), o que acarreta em aumento intracelular dos níveis de  $Ca^{2+}$ , que por sua vez, entra na mitocôndria e causa aumento da produção de ROS. Fonte: Bradley, 2019.

### Capítulo 2

**Figura 2.** Esquema representativo do delineamento experimental. No dia 0 do protocolo de sincronização as Ovuladoras (D-OV) recebiam um implante intravaginal de progesterona (P4) e a aplicação (i.m.) de 2mg de Benzoato de estradiol. No dia 2 do protocolo das D-OV, iniciava-se o protocolo (D0) das doadoras superestimuladas, com o mesmo procedimento das D-OV. No D4 das D-FSH iniciava-se, de 12 em 12 horas, a superestimulação ovariana. No D8 do protocolo das D-OV, retirava-se o P4 e administrava (i.m.) 500 $\mu$ g de Cloprostenol sódico. Vinte e quatro horas após a retirada de P4 (D-OV), as doadoras de ovócitos imaturos (D-IMA) eram aspiradas com meio suplementado de 500 $\mu$ m de IBMX. Os ovócitos eram rastreados e selecionados e, após isso, submetidos para a maturação *in vitro* (MatV) ou para a maturação TIFOI (MatT). Simultâneo à TIFOI, era realizado a indução da ovulação com 50mg de Lecirelina. No mesmo instante, as D-FSH também eram induzidas, para que, após 22 horas, fosse possível coletar os ovócitos de todos os sistemas de maturação.

**Figura 3.** Figuras representativa dos diferentes estágios da meiose dos ovócitos: (a) VG: vesícula germinativa; (b) MI: metáfase I; (c) AI: anáfase I; (d) TI: telófase I; (e) MII: metáfase II.

**Figura 4.** Gráfico: Área de gotas lipídicas em razão da área total dos ovócitos maturados em diferentes sistemas. Análise estatística realizada pelo teste de Tukey (GLIMMIX) ( $p < 0.001$ ). Imagem: microscopia confocal de ovócitos corados com Bodipy 493/503. a: ovócito imaturo (IMA); b: ovócito maturado *in vitro* (MatV); c: ovócito maturado *in vivo* (MatS); d: ovócito maturado pela TIFOI (MatT).

**Figura 5.** Avaliação ultraestrutural de ovócitos bovinos maturados em diferentes sistemas. A: ooplasma de ovócito imaturo; B e C: periferia ovócito imaturo; D: ooplasma ovócito maturado *in vitro* (MatV); E e F: periferia ovócito maturado *in vitro* (MatV); G: ooplasma ovócito maturado *in vivo* (MatS); H e I: periferia ovócito maturado *in vivo* (MatS); J: ooplasma ovócito maturado *in vivo*, pela TIFOI (MatT); K e L: periferia ovócito maturado *in vivo*, pela TIFOI (MatT). ZP: Zona Pelúcida; PV: Espaço Perivitelinico; GC: Grânulos Corticais; M: Mitocôndria; Mi: Microvilosidades; V: Vacúolo. IMA: Ovócitos imaturos; MatV: Ovócitos maturados *in vitro*; MatS: Ovócitos maturados *in vivo*; MatT: Ovócitos maturados *in vivo* (TIFOI).

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Informações sobre os primers específicos usados para análise da amplificação dos fragmentos dos genes pela qPCR.
- Tabela 2** – Avaliação da maturação nuclear de ovócitos bovinos submetidos à Maturação por Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI; MatT) por vinte e duas horas.
- Tabela 3** – Avaliação da maturação nuclear de ovócitos bovinos aspirados em meio suplementado com 3-isobutyl-methylxanthine (IBMX; 500  $\mu$ M) e avaliados 8 horas após aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU).
- Tabela 4** – Porcentagem da área ocupada pelos lipídios em razão da área total dos ovócitos maturados em diferentes sistemas.

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

AC = Adenil ciclase  
 ACSS2 = *Acyl-CoA Synthetase Short Chain Family Member 2*  
 AI = Anáfase I  
 AMPc = Adenosina monofosfato cíclico  
 AREG = Ampiregulina  
 ATP = Adenosina trifosfato  
 BMP-15 = Proteína morfogênica óssea-15  
 BSA= Albumina sérica bovina  
 BTC = Betacelulina  
 CCOs = Complexos cumulus ovócitos  
 CCs = Células do cumulus  
 Cdc25 = Ciclo de divisão celular 25  
 CDK1 = Quinase 1  
 CES = Campo Experimental Sucupira  
 CEUA = Comitê de Experimentação e Uso Animal  
 CG = Células da granulosa  
 CGPs = Células germinativas primordiais  
 CIV = Cultivo *in vitro*  
 CP = Corpúsculo polar  
 D-FSH = Doadoras superestimuladas, ovócitos maturados *in vivo*  
 D-IMA = Doadoras de ovócitos imaturos  
 DMSO = Dimethyl Sulfoxide  
 D-OV = Ovuladoras, maturação *in vivo* pela TIFOI  
 EEs = Ésteres Esteróis  
 EGFs = Fatores de Crescimento Epidermal  
 ELOVL1 = *Fatty Acid Elongase 1*  
 EREG = Epirregulina  
 FABP3 = *Fatty Acid Binding Protein 3*  
 FF = Fluido folicular  
 FIV = Fecundação *in vitro*  
 Fsh = Hormônio folículo estimulante  
 GAPj = Junções tipo GAP  
 GCs = Grânulos corticais  
 GDF9 = Fator de diferenciação e crescimento-9  
 GMPc = Monofosfato cíclico de guanosina  
 GnRH = Hormônio liberador de gonadotrofinas  
 GL = Gota Lipídica  
 i.m. = injeção intra-muscular  
 IBMX = 3-isobutyl-methylxanthine  
 IMA = Ovócitos imaturos  
 LH = Hormônio luteinizante  
 LRA = Laboratório de Reprodução Animal  
 MAPK = Proteína mitogênica kinase ativada  
 Mat = Maturação através da TIFOI  
 MatS = Maturação por superestimulação ovariana  
 MatV= Maturação através do sistema *in vitro*  
 MET = Microscopia Eletrônica de Transmissão

MI = Metáfase I  
MII = Metáfase II  
MIV = Maturação *in vitro*  
MPF = Fator promotor de meiose  
NaCl = Solução salina 0,9%  
NPPC = Peptídeo natriurético tipo C  
NPR2 = Receptor 2 do peptídeo natriurético  
OPU = Aspiração folicular guiada por ultrassom  
PBS = Solução tampão fosfato salina  
PDE = Fosfodiesterases  
PI = Prófase I  
PIVE = Produção *in vitro* de embriões  
PKA = Proteína quinase A  
PVP = Polivinilpirrolidona  
qPCR = PCR em tempo real  
RE = Retículo endoplasmático  
RNAm = RNA mensageiro  
ROS = Espécies reativas de oxigênio  
SFB= Soro fetal bovino  
SOV = Superestimulação ovariana  
TCM 199 =Meio de cultura de células 199  
TGF $\beta$  = Fator de crescimento de transformação beta  
TGs = Triacilgliceróis  
TI = Telófase I  
TIFOI = Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos  
TZPs = Projeções transzonais  
VG = Vesícula germinativa  
VGBD = Vesícula germinativa rompida

## **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais países responsáveis pela a produção de alimentos no mundo, sendo hoje o segundo maior produtor e o maior exportador de carne bovina (USDA, 2019). Em relação à produção leiteira, produz cerca 34,23 milhões de toneladas, anualmente, e se encontra em quarto lugar no ranking mundial. Apesar dos resultados expressivos, que refletem significativamente na economia brasileira, a eficiência de produção tanto de carne quanto de leite, ainda é baixa, quando comparado com outros países. A taxa de desfrute brasileira, por exemplo, é inferior à dos EUA e Austrália (ABIEC, 2018). Além disso, a total produção leiteira brasileira representa apenas 15% do que é produzido pelos EUA (FAO, 2016).

As projeções de demanda de alimentos oriundos da carne, leite, e seus respectivos derivados, para os próximos 20 anos, é estimada em um aumento de 20% (EMBRAPA, 2018). Para atender esta necessidade, uma das alternativas é intensificar os sistemas de produção com o uso de biotecnologias. Dentre as alternativas para aumentar a produtividade do rebanho bovino é a produção de embriões, pois, permite o acasalamento entre os animais de melhor qualidade zootécnica gerando, de uma maneira mais acelerada, um maior número de descendentes geneticamente “superiores”.

Cerca de 66% dos embriões produzidos, no mundo, são de origem in vitro (PIVE), sendo que desses, aproximadamente 1/3 são produzidos no Brasil. Esses dados mostram o importante papel do país no cenário mundial quanto ao uso dessa tecnologia. De fato, dos embriões produzidos no Brasil atualmente, 92% são oriundos de PIVE (Viana et al., 2018).

Apesar de bem estabelecida e difundida, a técnica ainda possui algumas limitações. Apenas 40 a 50% dos ovócitos submetidos ao processo de maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo in vitro (CIV), conseguem atingir o estágio de blastocisto (Sprícigo et al., 2015; Nagano, 2019). Além disso, embriões produzidos no sistema in vitro possuem menor resistência a criopreservação e menor capacidade de estabelecer uma

gestação, quando comparados com embriões produzidos *in vivo* (Farin et al., 1995; Aksu et al., 2012; Sudano et al., 2014). Essa pior qualidade e maior crio-sensibilidade parece ser devido ao elevado conteúdo lipídico presente nos embriões PIVE.

A presença de lipídios intracelulares é importante em ovócitos e embriões, para a homeostasia energética, proteção celular, regulação do metabolismo proteico e função nuclear. Entretanto, o cultivo *in vitro* afeta a quantidade, composição, tamanho e outras propriedades dos lipídios que podem afetar o potencial de desenvolvimento e, principalmente, a abundância de lipídios (Amstislavsky et al., 2018).

A maioria dos estudos nessa área têm focado no efeito do cultivo embrionário na quantidade de lipídios de embriões bovinos, contudo, trabalhos recentes têm demonstrado que a MIV também induz a um maior acúmulo de lipídios no ovócito, mesmo na ausência de soro fetal bovino (SFB) (Aardema et al., 2011; Del Collado et al., 2016). Por outro lado, quando a maturação do ovócito ocorre dentro do folículo, *in vivo*, este fenômeno não é observado (Del Collado et al., 2016). Sugerindo que esse efeito pode ser devido ou a retirada prematura dos ovócitos do folículo ou ao tipo de ambiente onde a maturação é realizada.

Recentemente, foi relatada uma terceira opção para se produzir embriões bovinos, através da Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI) (Sprícigo et al., 2016). Dentre as vantagens desta técnica, se destaca a possibilidade de realizar todas as etapas da produção de embriões, inclusive a maturação, completamente *in vivo*, proporcionando mais uma ferramenta para os estudos da maturação ovocitária.

Assim, o presente estudo visou avaliar se ovócitos retirados prematuramente do folículo, mas maturados em ambiente *in vivo*, utilizando a TIFOI, apresentam o mesmo acúmulo de lipídios que os maturados *in vivo*. Para isso ovócitos bovinos maturados *in vitro*, maturados *in vivo* após superestimulação ovariana e maturados *in vivo* após TIFOI, foram comparados quanto a características moleculares, morfológicas e funcionais.

## 1.1 HIPÓTESE

Ovócitos bovinos maturados *in vivo*, através da TIFOI, teriam características semelhantes aos maturados pela superestimulação e diferenças entre os maturados *in vitro*, relacionados com o acúmulo de lipídios.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Geral

Avaliar se os sistemas de maturação: *in vivo*, *in vitro* e TIFOI afetam o acúmulo de lipídios em ovócitos bovinos.

### 1.2.2 Específicos

a) Quantificar as gotículas de lipídios presentes em ovócitos bovinos maturados nos sistemas *in vivo*, *in vitro* e TIFOI;

b) Identificar diferenças estruturais nos ovócitos bovinos maturados em diferentes sistemas (*in vivo*, *in vitro* e TIFOI) através da microscopia eletrônica de transmissão (MET);

c) Avaliar a expressão de genes relacionados com o metabolismo de lipídios em ovócitos maturados em diferentes sistemas.

## 1 REVISÃO LITERATURA

### *2.1. Ovogênese e Foliculogênese*

A maturação ovocitária é o processo no qual o ovócito se prepara para ser fecundado e se desenvolver em embrião. Envolve mudanças nucleares, citoplasmáticas e moleculares. A formação do ovócito inicia durante a fase fetal, antes mesmo do nascimento do indivíduo (Fair, 2003). Entre 30 a 60 dias de gestação, no feto bovino, as células germinativas primordiais (CGPs), derivadas do início do desenvolvimento embrionário, migram-se para a região da formação das gônadas, proliferam-se e diferenciam-se em ovogônias, as quais são circundadas por uma camada de células somáticas, consideradas precursoras das células da granulosa (CGs). As ovogônias são mitoticamente ativas, até atingirem um número determinado de divisões. A partir de então, ocorre a primeira interrupção do processo meiótico, em diplóteno da prófase I (PI), estágio em que os ovócitos permanecem até a puberdade do animal (Oktem & Oktay, 2008; Ferreira et al., 2009).

No início da ovogênese, durante as divisões mitóticas, há formação de pontes citoplasmáticas entre uma célula e outra, resultado de divisões celulares incompletas. Estas pontes, sincícios, agrupam precursores de células somáticas que irão participar na formação dos folículos primordiais (Epifano & Dean, 2002). Uma vez formados, os folículos primordiais representam a reserva, não renovável, dos gametas disponíveis para serem recrutados ao longo das diferentes fases da vida reprodutiva da fêmea. Contudo, apenas 0,1% destes folículos conseguem prosseguir com o desenvolvimento até a ovulação (Knight & Glistler et al., 2006).

O crescimento e desenvolvimento do ovócito e do folículo são interdependentes. Os estágios iniciais da foliculogênese independem de estímulos

gonadotrópicos e são mediados por sinalizações parácrinas (Kol & Adashi, 1995). A medida que ocorre o crescimento do folículo, fatores de crescimento, dentre os quais, se destacam o fator de crescimento de transformação beta (TGF $\beta$ ), fator de diferenciação e crescimento-9 (GDF9) e a proteína morfogênica óssea-15 (BMP-15), irão regular a ativação e desenvolvimento folicular e do ovócito através da sinalização parácrina entre células da granulosa e ovócito (Lodde et al., 2017).

Com o crescimento do ovócito e a multiplicação o das células foliculares ocorre a formação do folículo secundário, nessa fase ocorrem vários eventos incluindo a formação da zona pelúcida ao redor do ovócito (Fair et al., 1995). A medida que ocorre o crescimento do folículo há a formação de projeções responsáveis pelas comunicações entre o ovócito e as células somáticas do folículo que, por sinal, são essenciais para ambas as células, pois, permitem uma troca, bidirecional, de nutrientes, fatores de sinalização e hormônios (Eppig et al., 2002; Lodde et al., 2017). As projeções celulares transzonais (TZPs) são proeminências das células somáticas que circundam o ovócito, e que tem ligação direta com a membrana plasmática do ovócito, facilitando a comunicação entre ovócito e células do cumulus/granulosa (Lima et al., 2016). Sugere-se que esse contato entre as células possibilita o transporte moléculas, como: aminoácidos, metabólitos, íons, nucleotídeos e lipídios, durante o crescimento e maturação do ovócito. Estima-se que haja mais de 3.000 TZPs, cada uma com aproximadamente 2  $\mu$ m de diâmetro, nos complexos cumulus ovócitos (COCs) (Macaulay et al., 2014). As TZPs partem da superfície das células da granulosa e entram em contato com a membrana plasmática do ovócito, onde estão presentes junções comunicantes do tipo GAP (GAPj), que são canais intercelulares que permitem o transporte de moléculas metabólitos de baixo peso molecular. Essas junções permitem uma comunicação bidirecional com as CC que é essencial durante todo o crescimento e maturação do ovócito.

O período final do desenvolvimento folicular (folículo terciário) é caracterizado pela formação do antro (cavidade) preenchida por líquido, fonte de substâncias derivadas de secreções das células foliculares, como: esteróides, enzimas, glicoproteínas, lipoproteínas e fatores de crescimento (Van Den Hurk & Zhao, 2005), fundamentais para o ovócito. É também neste momento que as CGs, adjacentes ao ovócito, se diferenciam e originam às células do cumulus (CCs), formando um complexo interdependente, denominado de complexo cumulus ovócito (COCs) (Yeo et al., 2009).

Os folículos terciários são dependentes de gonadotrofinas, onde o recrutamento, seleção e dominância são dependentes dos níveis hormonais do hormônio folículo estimulante (FSH), cuja atuação dirigida às células da granulosa resulta em

proliferação celular, síntese de esteroides e a expressão de receptores para os Fatores de crescimento epidérmico (EGFs) e ao hormônio luteinizante LH (Martins et al., 2008). O folículo pré ovulatório é sensibilizado pela maior frequência dos pulsos de LH (Hyttel et al., 1997) que resultará na liberação de um ovócito maduro durante a ovulação (Sirard et al., 2006).

## **2.2. *Maturação ovocitária***

Desde a entrada da meiose o ovócito fica retido em diplóteno da prófase I (PI) e, apenas retoma a meiose, com o pico do hormônio luteinizante (LH) pouco antes da ovulação. O estímulo do LH induz rompimento da vesícula germinativa (VGBD), condensação da cromatina, e progressão da meiose, passando pelos estágios de metáfase I, anáfase I, telófase I. O primeiro ciclo meiótico se completa com a extrusão do primeiro corpúsculo polar e, entrada na segunda divisão meiótica, permanecendo retido em metáfase II até a fecundação (Van Der Hurk & Zhao, 2005). Contudo, até o momento que ocorre o pico do LH, fatores inibidores produzidos pelo ovócito e folículo, previnem esta retomada (Dekel et al., 1981; Webb et al., 2002; Mehlmann, 2005).

O fator responsável por reter o ovócito em PI é a concentração da adenosina monofosfato cíclico (AMPc) intra-ovocitário (Cho et al., 1974). Altas concentrações mantêm o ovócito retido e a redução precede a retomada da meiose. O controle do AMPc intra-ovocitário é regulado a partir da atividade de duas enzimas: adenil ciclase (AC) e fosfodiesterase (PDE), responsáveis pela síntese e degradação, respectivamente (Conti et al., 2002). O AMPc pode ser produzido pelo ovócito e pelas células somáticas do folículo (Tripathi et al., 2010). Os altos níveis de AMPc no ovócito ativam uma proteína denominada de quinase A (PKA), que por sua vez, impede a ativação do responsável pelo início da maturação, o fator promotor de meiose (MPF), através das quinases Wee1B/Myt1, mantendo o ovócito retido em PI. O MPF é composto por uma quinase 1 (CDK1; subunidade catalítica) e uma ciclina B (B1, B2 e B3; subunidade reguladora). Sua forma ativa assegura que o ciclo celular prossiga de forma correta, promove a fosforilação de proteínas responsáveis pela condensação da cromatina, reorganização do citoesqueleto e de outras organelas citoplasmáticas (Kim et al., 2000; Krischek & Meinecke, 2002; Holt; et al, 2013). A redução do nível de AMPc intra-ovocitário inativa a PKA, cuja redução resultará na atividade da Cdc25 fosfatase, que desfosforila a CDK1 e ativa o MPF (Tripathi et al., 2010).

Outro evento determinante para a manutenção do AMPc no ovócito é o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Este é produzido pelas células somáticas que circundam o ovócito e têm a função de inibir uma enzima responsável pela degradação do AMPc. Existem inúmeras PDE, a PDE do tipo 3 é específica do ovócito (Nogueira et al., 2003; Tripathi et al., 2010). As CCs expressam RNA mensageiro (RNAm) do GMPc ligado à membrana do receptor 2 do peptídeo natriurético (NPR2) e as CGs expressam, em maior intensidade, seu ligante cognato, precursor do peptídeo natriurético tipo C (NPPC) (Zhang et al., 2011). Desta forma, o NPPC produzido nas CG se liga aos receptores das CCs para produzir GMPc. Estes são transferidos, via GAPj, para o ovócito, reprimindo a atividade da PDE3, mantendo altos os níveis de AMPc (Zhang et al., 2011).

Um pouco antes da ovulação, o LH se liga aos seus receptores presentes nas células da granulosa mural do folículo, e induz uma rápida expressão dos membros da família dos EGFs: Ampiregulina (AREG), Epirregulina (EREG) e Betacelulina (BTC). Estes fatores ligam-se aos seus receptores nas CCs e ativam a via da proteína Mitogênica kinase ativada (MAPK) (Park et al., 2004; Ashkenazi et al., 2005; Conti et al., 2006). Esta ativação interrompe a comunicação das CCs com o ovócito, provocando o fechamento das GAPj. Sendo assim, há diminuição do transporte de AMPc e GMPc para o ovócito. Com isso, há redução da atividade da PKA, que ativa a Cdc25 fosfatase e inativa Wee1B/Myt1, resultando na desfosforilação da CDK1 e ativação do MPF (Van Den Hurk & Zhao, 2005; Tripathi et al., 2010; Bilodeau-Goeseels, 2011).

In vitro, a simples retirada do ovócito do ambiente folicular remove os fatores inibitórios diminuindo ao AMPc e induzindo a retomada da meiose (Sirard et al., 2006).

Além da segregação e divisão dos cromossomos, que ocorre na maturação nuclear, a maturação também envolve a reorganização de organelas que migram pelos microtúbulos e microfilamentos, discreta síntese de RNA (Macaulay et al., 2016), síntese de proteínas e fatores transcricionais (Lodde et al., 2008). Estes processos, os quais são referidos como maturação citoplasmática e molecular, são de fundamental importância para garantir o desenvolvimento inicial do embrião até a ativação do genoma embrionário, que ocorre no bovino com oito a dezesseis células.

Um dos eventos importantes que ocorrem durante a maturação citoplasmática é a migração das mitocôndrias. As mitocôndrias são extremamente importantes para o fornecimento de energia consumido durante a maturação. Elas sintetizam o ATP necessário para a síntese de proteínas, que irão suportar o processo de maturação e, subsequentemente, o desenvolvimento embrionário inicial (Krisher et al., 1998; Stojkovic et al., 2001). Tanto in

vivo, quanto *in vitro*, ao longo da maturação ovocitária, as mitocôndrias se movem da região periférica, para uma distribuição mais dispersa, por todo citoplasma do ovócito (Kruip et al., 1983; Hyttel et al., 1986 e 1997). Além disso, o número de cópias passa de aproximadamente 10, no estágio de célula germinativa, para mais de 100.000 cópias ao longo da maturação (Cummins et al., 2004; Tarazona et al., 2006; Shoubridge & Wai, 2007; Dumollard et al., 2008). O número de mitocôndrias é considerado alto em ovócitos, podendo ocupar 30% do volume citoplasmático (Dumollard et al., 2009). Essa característica é importante não somente para o metabolismo do ovócito, mas, porque pode predizer a competência do mesmo, pois uma redução no número de cópias ou uma desorganização mitocondrial pode afetar as fases iniciais da embriogênese (Shoubridge & Wai, 2007).

O retículo endoplasmático (RE) é formado a partir de túbulos membranosos e vesículas, organizados em vários subcomponentes. Esta organela possui diferentes funções no ovócito, entre elas, metabolismo de lipídios, manutenção de proteínas, compartimentalização do núcleo, regulação de  $\text{Ca}^{2+}$  e síntese de membranas (Lippincott-Schwartz et al., 2000). Por participar da regulação do  $\text{Ca}^{2+}$ , o RE é um importante sinalizador intracelular. Os mecanismos que envolvem a remodelação deste íon no ovócito, em diferentes eventos, são de grande importância (Machaca, 2007), estando envolvidos na ativação ovocitária (Kline, 2000) e sinalização de vias apoptóticas (Bradley, 2019). Mudanças estruturais e bioquímicas ocorrem com o RE ao longo da maturação, relacionados com a regulação do  $\text{Ca}^{2+}$ , que por fim são encontrados nas regiões corticais, com 1-2  $\mu\text{m}$ , em todo citoplasma (Stricker, 2006).

Os grânulos corticais (GCs) são vesículas derivadas do complexo de Golgi. Estas organelas, exclusivas do ovócito, têm em sua composição uma população diversificada de proteínas, moléculas estruturais, enzimas e glicosaminoglicanos. Nos ovócitos imaturos, os GCs são distribuídos em grupos por todo citoplasma e, ao longo da maturação, vão migrando para periferia. Sua principal função é prevenir a polispermia (Hosoe & Shioya et al. 1997). Caso haja entrada de mais de um espermatozoide, o zigoto resultante se torna inviável e, normalmente, se degenera antes de seguir com as divisões mitóticas. O mecanismo realizado pelos GCs para evitar esta anomalia envolve liberação do seu conteúdo no espaço perivitelínico, provocando mudanças estruturais na zona pelúcida, após a ativação do ovócito mediado pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  (Haley & Wessel, 2004), pelo RE, e zinco (Duncan et al., 2016).

Com relação aos aspectos moleculares, apesar de haver mínima transcrição durante a maturação, o maior armazenamento de RNAs ocorre durante o crescimento do

ovócito, sendo esses estocados para serem utilizados posteriormente. Para que esse estoque seja formado, esse RNA precisa ser protegido contra degradação, até que os sinais de tradução sejam liberados com o início da maturação e desenvolvimento embrionário inicial (Fulka-Jr et al., 1998). Vários mecanismos estão envolvidos com a ativação do RNAm que se encontra temporariamente inativo (Thach, 1992; Colgan et al., 1996; Gavin & Schorderet-Slatkine, 1997; Fan & Sun, 2004). A poliadenilação (adição de adenina na porção 3' linha do RNAm) estimula a adesão de moléculas repressoras ligadas a porção 5' linha do RNAm que, ao chegar ao citoplasma, torna-se menor e heterogêneo (Tomek et al., 2002), não sendo traduzidas pelos ribossomos (Curtis et al., 1995). Durante a maturação do ovócito há o prolongamento desta região do RNAm que ocasionará na tradução das proteínas (Shim et al., 1997). Proteínas e moléculas, marcadores da maturação citoplasmática, como glutathione (Ali et al., 2003), moléculas de ATP (Stojkovic et al., 2001) e enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase) (Cetica et al., 2001) influenciam, diretamente, no sucesso da maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial (Sirard, 2001; Ferreira et al., 2009).

### ***2.3. Lipídios na maturação***

Lipídios são moléculas, anfipáticas ou hidrofóbicas, com amplas atribuições biológicas no organismo, o que inclui: uma rica fonte de energia, capaz de gerar três vezes mais moléculas de ATP, quando comparado com a glicose. Além de participarem como mediadores de sinalizações celulares e como constituintes de membranas plasmáticas e de organelas (Dunning et al., 2014). Dentre os lipídios encontrados em ovócitos bovinos, os Triacilgliceróis (TGs), também conhecidos como triglicerídeos, estão em predominância (Sturme et al., 2009). Estes, e os Ésteres Esteróis (EEs), como o colesterol, podem estar circundados por uma monocamada de fosfolipídios de superfície e por proteínas de membrana, cuja síntese é realizada no RE, dando origem à uma dinâmica organela citoplasmática denominada de Gota Lipídica (GL) (Ohsaki et al., 2014). A síntese da GL se inicia com a produção de um lipídio neutro, na maioria das vezes, por TGs, no RE. Ao longo de sua formação, algumas proteínas, como as da família PLIN, responsáveis pela manutenção da GL, alojam-se na superfície de sua membrana. Estas podem estar associadas com a regulação da síntese lipídica do RE.

O piruvato derivado da glicólise é conhecido como um importante substrato para a produção de energia em ovócitos na maioria das espécies de mamíferos (Dumollard et

al., 2008). Contudo, o ovócito não tem capacidade para metabolização da glicose, esta habilidade só acontece após a ativação do genoma embrionário, com oito a dezesseis células no bovino. Até então, as CCs são responsáveis pelo fornecimento destas moléculas para o ovócito. Portanto, lipídios são uma importante fonte de energia para o ovócito até as fases iniciais do desenvolvimento embrionário (Sturmey and Leese, 2003).

As reações que culminam com a produção de ATP permitem formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) capazes de gerar danos oxidativos, principalmente em proteínas, o que inclui o DNA e DNAm. De modo geral, a produção de ROS atua como um mecanismo regulador natural da célula (Dumollard et al., 2009; Quinlan et al., 2013), porém, a produção prolongada de ROS pode causar estresse oxidativo, precursor de vias apoptóticas. A produção de ATP, oriundo dos lipídios, ocorre nas mitocôndrias através da  $\beta$ -oxidação. Este mecanismo contribui na aquisição de competência do ovócito para o desenvolvimento embrionário (Dunning et al., 2010).

Esta via energética é necessária tanto para retomada da meiose quanto para o término da maturação nuclear dos ovócitos bovinos (Paczkowski et al., 2013). A inibição do metabolismo dos lipídios reflete diretamente no desenvolvimento embrionário, pois, ovócitos imaturos expostos a inibidores dos carreadores de lipídios para as mitocôndrias exprimem uma menor  $\beta$ -oxidação e, como consequência, menor potencial para o desenvolvimento embrionário (Ferguson & Leese et al., 2006; Dunning et al., 2010). Alguns trabalhos suplementam o meio de cultivo com co-fatores essenciais para a entrada de lipídios nas mitocôndrias e, como resultado, aumento significativo da  $\beta$ -oxidação, o que está relacionado com a maior competência para o desenvolvimento embrionário (Dunning et al., 2010). Estes co-fatores (L-carnitina, com propriedades antioxidantes) estão associados com a redistribuição das GL pelo ovócito (Chankitisakul et al., 2013) e pela maior atividade mitocondrial (Hashimoto, 2009).

Quando a maturação é realizada *in vitro* há uma redução do metabolismo lipídico, através da  $\beta$ -oxidação, em ovócitos e CCs, comparando com os ovócitos maturados *in vivo* (Spindler et al., 2000). Cerca de 15 genes envolvidos com o metabolismo de lipídios são menos expressos em ovócitos maturados *in vitro* do que os maturados *in vivo* (Dunning et al., 2014).

### 2.3.1 Acúmulo de lipídios e seus efeitos

Vários trabalhos mostram um aumento no acúmulo de lipídios, quando a maturação é realizada *in vitro* (Abe et al., 2002; Aardema et al., 2011; Del Collado et al., 2016). Este aumento pode estar associado com a composição do meio, já que ovócitos bovinos maturados na presença de Soro Fetal Bovino (SFB) possuem maior conteúdo lipídico do que os maturados em sua ausência (Kim et al., 2001; Del Collado 2016). Contudo, ovócitos bovinos maturados *in vitro*, mesmo na ausência de SFB, apresentam maior conteúdo lipídico que ovócitos maturados *in vivo* (Aardema et al., 2011; Del Collado et al., 2016). Não se sabe exatamente o mecanismo que induz esse acúmulo, entretanto, até pouco tempo acreditava-se que este aumento do conteúdo lipídico ocorria por simples difusão do meio para os ovócitos.

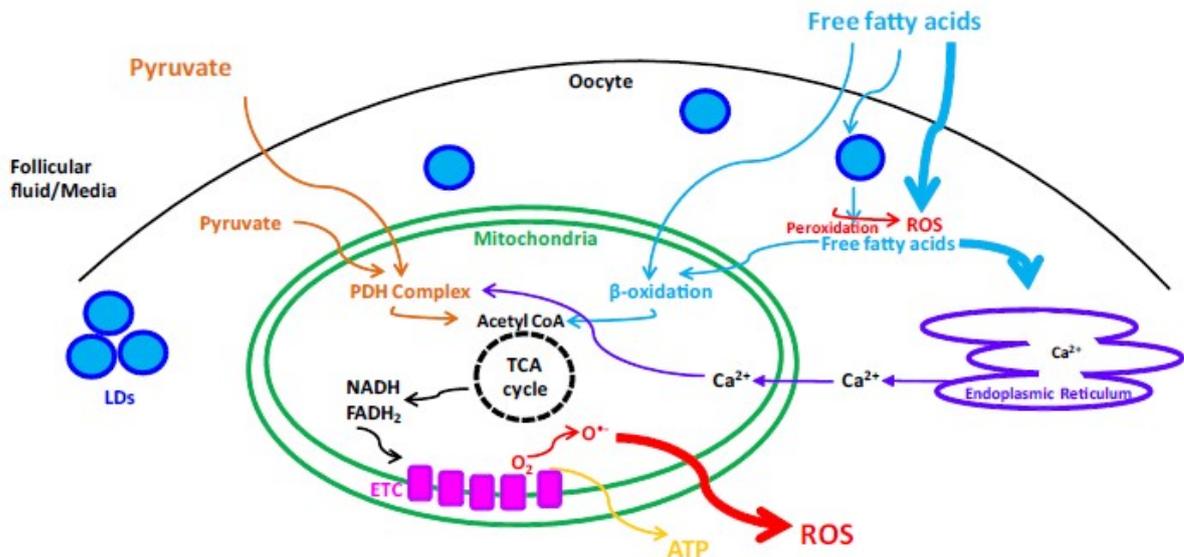
Recentemente, foi demonstrado um possível mecanismo de transporte de lipídios através das comunicações intercelulares. Foi possível identificar uma proteína capaz de carrear lipídios através das TZPs, de forma livre ou por vesículas. A proteína da família *Fatty Acid Binding Proteins*, isoforma 3 (FABP3), também conhecida como proteína cardíaca, foi detectada por imunofluorescência transportando lipídios ao longo da maturação ovocitária, sendo às primeiras nove horas as mais críticas para esse evento (Del Collado, et al., 2017) Auclair et al., (2013), demonstraram que ovócitos maturados na ausência das CCs (desnudos) apresentaram uma menor concentração de lipídios, e também uma menor competência para o desenvolvimento. Del Collado e colaboradores (2017) impediram a comunicação através de uma substância que neutraliza filamentos de actina (composição das TZPs) e observaram que não houve aumento no conteúdo lipídico, nos ovócitos que receberam o tratamento ao longo da maturação. Esses autores concluíram que as projeções possuem um papel fundamental para a ocorrência deste evento.

*In vivo* o acúmulo de lipídios é observado em situações de distúrbios metabólicos. Comumente relatado em vacas leiteiras, o período inicial de produção é caracterizado pelo balanço energético negativo, onde o consumo do animal não é suficiente para prover a demanda energética para produzir leite. Este período crítico está associado com aumento da circulação sistêmica de lipídios, devido a mobilização de reservas armazenadas nos tecidos, que irão repercutir no fluido folicular, tendo influência negativa na fertilidade dos animais (Leroy et al., 2008). Além disso, em ocasiões de dietas ricas em gordura e/ou em casos de obesidade em mulheres, cuja exposição dos COCs a este ambiente acarreta em menor competência para o desenvolvimento embrionário e infertilidade (Robker et al., 2009).

Os principais ácidos graxos prevalentes nos ovócitos bovinos são o Palmítico, Esteárico, Oleico e Linoleico (Aardema et al., 2013). As variabilidades entre a concentração dos ácidos graxos presentes podem indicar diferentes requerimentos, fisiológicos, quanto a sua presença. Contudo, podem influenciar negativamente no desenvolvimento embrionário. Ovócitos murinos, expostos ao FF de humanos, rico em ácidos graxos e TGs, durante a maturação, apresentaram aumento no conteúdo lipídico e prejuízo na maturação nuclear dos ovócitos (Yang et al., 2010). Além disso, dano na atividade mitocondrial, o que causa estresse do RE (Wu et al., 2012) e estresse oxidativo (Igosheva et al., 2010)

Ácidos graxos saturados encontrados no ovócito, durante a maturação, podem causar respostas lipotóxicas e, como consequência, prejudicar o desenvolvimento embrionário tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (Wu et al., 2010; O’Gorman et al., 2013). Estas respostas lipotóxicas resultam em menor taxa de maturação dos ovócitos, mitocôndrias com morfologia alterada, e blastocistos de menor qualidade, incluindo o menor número de células e mecanismos apoptóticos (van Hoeck et al., 2011). Além disso, podem promover mecanismos de peroxidação lipídica no citoplasma, gerando excesso de ROS e peróxidos lipídicos tóxicos, reduzindo à capacidade protetora da glutathione (Igosheva et al., 2010). Este fenômeno não ocorre exclusivamente no ovócito, mas também nas células somáticas que o circundam, o que também influencia no desenvolvimento do ovócito (Wu et al., 2010, 2012).

O excesso de ROS é altamente citotóxico e prejudicial ao DNA nuclear e DNAm, podendo causar no ovócito anormalidades mitocondriais (Turner & Robker, 2014), e como consequência, vias apoptóticas são iniciadas (Wu et al., 2010; Engin, 2017). Somado a esses eventos, os danos oxidativos provocam disfunções ao RE, havendo maior perda de  $Ca^{2+}$  para o citoplasma, o que prejudica a homeostase celular e alterações mitocondriais (Malhotra e Kaufman 2007; Wu et al., 2012)



**Figura 1.1** – Esquema mostrando a captação, pelo ovócito, de piruvato e ácidos graxos do fluido folicular ou do meio. Os ácidos graxos são armazenados em gotas lipídicas (LDs) ou absorvidos pelas mitocôndrias para a  $\beta$ -oxidação. O acúmulo de lipídios pode levar ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), causando estresse do retículo endoplasmático (RE), o que acarreta em aumento intracelular dos níveis de  $Ca^{2+}$ , que por sua vez, entra na mitocôndria e causa aumento da produção de ROS. Fonte: Bradley, 2019.

#### 2.4 Avaliações de lipídios em ovócitos bovinos

Diversas técnicas já foram utilizadas para determinar que os TGs são os principais lipídios encontrados em ovócitos (Sturmey et al., 2009). Os primeiros estudos utilizavam a extração, com base no peso da amostra, antes e após o procedimento (Loewenstein e Cohen, 1964). Hoje, as análises de microscopia de fluorescência são uma alternativa para avaliar processos celulares, dentre eles, a formação de gotículas de lipídios sob condições fisiológicas e/ou que acarretam em acúmulo excessivo de lipídios.

As técnicas de fluorescência permitem análises semi-quantitativas dos lipídios presentes, pois, durante as avaliações, podem ocorrer variabilidades na intensidade do fluoróforo devido à fotodegradabilidade durante a elaboração da imagem. Contudo, são amplamente relatados em ovócitos e embriões bovinos (Aardema et al., 2011; Abe et al., 2002; Annes et al., 2018; Crosier et al. 2001; Del Collado et al., 2016, 2017;; Sudano et al., 2011;; Yang et al., 2010). Dentre os principais corantes, se destacam: Sudan Black B, Nile Red, e Bodipy 493/503.

O Sudan Black B é um corante lipofílico descrito em avaliações do conteúdo lipídico no citoplasma de ovócitos (Annes et al., 2018) e embriões bovinos (Abe et al., 2002; Sudano et al., 2011). Permite fixar as estruturas para depois avalia-las em microscopia óptica. As imagens obtidas são transformadas para uma escala de cinza e analisadas quanto a área ocupada pelos lipídios no ovócito ou embrião (Abe et al., 2002). Um limitante desta técnica é que não permite a avaliação de todo o ovócito ou embrião, apenas de alguns cortes específicos, diferente de outros fluorescentes, que permitem avaliar o ovócito como um todo, em vários cortes.

Nile Red é um corante fluorescente lipofílico, comumente utilizado para avaliar lipídios em ovócitos. Quanto maior a quantidade de GL presentes no ovócito, maior será a quantidade de luz fluorescente emitida. Após a coloração, existe a possibilidade de diferenciar as GL (fluorescente amarelo) dos fosfolipídios de membrana (fluorescem em espectro alaranjado) (Greenspan e Fowler, 1985). Apesar disso, foi mostrado a capacidade do fluoróforo em quantificar, de forma relativa, o conteúdo lipídico dos ovócitos (Genicot et al., 2005; Leroy et al., 2005). Contudo, independente dos resultados semelhantes, foi relatado um corante que produz um resultado mais robusto, Bodipy, quando comparado com o Nile Red (Yang et al., 2010)

O Bodipy 493/503 é um corante fluorescente específico para lipídios neutros. Os trabalhos mais recentes (Aardema et al., 2011; Del Collado et al., 2016, 2017) utilizaram deste corante para quantificar o acúmulo de lipídios em ovócitos imaturos e maturados. Assim como Nile Red, o fluoróforo Bodipy também permite armazenar as amostras, por até uma semana, para depois avaliar em microscopia de fluorescência. O acúmulo de lipídios é determinado a partir da razão entre a área ocupada pelos lipídios sobre a área total do ovócito.

### 3 REFERÊNCIAS

AARDEMA, H.; LOLICATO, F.; VAN DE LEST, C.H.; BROUWERS, J.F.; VAANDRAGER, A.B.; VAN TOL, H.T.; ROELEN, B.A.; VOS, P.L.; HELMS, J.B.; GADELLA, B.M. Bovine cumulus cells protect maturing oocytes from increased fatty acid levels by massive intracellular lipid storage. **Biology of Reproduction**, v. 88, p. 164, 2013.

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

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

AKSU, D.A. et al., Gene expression profiles of vitrified in vitro- and in vivo-derived bovine blastocysts. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 79, p. 613-25. 2012.

ALI, A.A.; BILODEAU, J.F.; SIRARD, M.A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v. 59, p. 939–49, 2003.

AMSTISLAVSKY, S.; MOKROUSOVA, V.; BRUSENTSEV, E.; OKOTRUB, K.; COMIZZOLI, P. Influence of Cellular Lipids on Cryopreservation of Mammalian Oocytes and Preimplantation Embryos: A Review. **Biopreservation and Biobanking**, p. 76-83, 2019.

ANNES, et al. Influence of follicle size on bovine oocyte lipid composition, follicular metabolic and stress markers, embryo development and blastocyst lipid content. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 31, p. 462-472, 2019.

ASHKENAZI, H. et al. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology*, v. 146, n. 1, p. 77-84, 2005.

Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne - ABIEC. Perfil da Pecuária no Brasil: **Relatório Anual**, 2018.

AUCLAIR, S. et al. Absence of cumulus cells during in vitro maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, v. 304, n. 6, p. E599-E613, 2013.

BILODEAU-GOESEELS, S. Cows are not mice: The role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, v. 78, n. 10–11, p. 734–743, 2011.

CETICA, P.D.; PINTOS, L.N.; DALVIT, G.C.; BECONI, M.T. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress on bovine oocyte in vitro maturation. *Iubmb Life*, v. 51, p. 57–64, 2001.

CHANKITISAKUL, V.; SOMFAI, T.; INABA, Y.; TECHAKUMPHU, M.; NAGAI, T. Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine in vitro matured oocytes. *Theriogenology*, v. 79, p. 590–598, 2013.

CHO, W.K.; STERN, S.; BIGGERS, J.D. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *Journal of Experimental Zoology*, v. 187, p. 383–386, 1974.

COLGAN, D.F.; MURTHY, K.G.K.; PRIVES, C.; MANLEY, J.L. Cell-cycle related regulation of poly(A) polymerase by phosphorylation. *Nature*, v. 384, p. 282–285, 1996.

CONTI M.; ANDERSEN C. B.; RICHARD F.; MEHATS C.; CHUN S. Y.; HORNER, K. et al. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 187, p. 153–159, 2002.

CROSIER, A. E.; FARIN, P. W.; DYKSTRA, M. J.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, C. E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. *Biol Reprod*, v. 64, p. 1375-1385, 2001.

CUMMINS, J.M. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, v. 115, p. 9-23, 2004.

CURTIS, D.; LEHMANN, R.; ZAMORE, P.D. Translational regulation in development. *Cell*, v. 81, p. 171–178, 1995.

DEKEL, N.; LAWRENCE, T.S.; GILULA, N.B.; BEERS, W.H. Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Dev Biol.*, v. 86, p. 356–62, 1981.

DEL COLLADO, M. et al. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during *in vitro* maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. *Reproduction, fertility, and development*, v. 28, p. 1721, 2016.

DEL COLLADO, M.; DA SILVEIRA, J.C.; SANGALLI, J.R. et al. Fatty Acid Binding Protein 3 And Transzonal Projections Are Involved In Lipid Accumulation During *In Vitro* Maturation Of Bovine Oocytes. *Sci Rep*, v. 7, p. 2645, 2017a.

DUMOLLARD, R.; CAMPBELL, K.; HALET, G.; CARROLL, J.; SWANN, K. Regulation of cytosolic and mitochondrial ATP levels in mouse eggs and zygotes. *Dev Biol*, v. 316, p. 431–440, 2008.

DUMOLLARD, R.; CARROLL, J.; DUCHEN, M. R.; CAMPBELL, K.; SWANN, K. Semin Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. *Cell Dev Biol*, v. 20, p. 346-53, 2009.

DUNCAN, F.E.; QUE, E.L.; ZHANG, N.; FEINBERG, E.C.; O'HALLORAN, T.V.; WOODRUFF, T.K. The zinc spark is an inorganic signature of human egg activation. **Sci Rep**, v. 6, p. 737, 2016.

DUNNING, K.; RUSSELL, D.; ROBKER, R. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and  $\beta$ -oxidation, **Reproduction**, v. 1, p. 148, 2014.

DUNNING, K.R.; ANASTASI, M.R.; ZHANG, V.J.; RUSSELL, D.L.; ROBKER, R.L. Regulation of fatty acid oxidation in mouse cumulus–oocyte complexes during maturation and modulation by PPAR agonists. **PLoS ONE**, v. 9, p. 87, 2014.

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

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Indicadores de desempenho na pecuária de corte: uma revisão no context da Plataforma + Precoce, 2018.

ENGIN, A. B. What Is Lipotoxicity? **Obesity and Lipotoxicity. Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 960, 2017.

EPIFANO, O.; DEAN, J. Genetic control of early folliculogenesis in mice. **Endocrinology and Metabolism**, v. 13, p. 169-173. 2002.

EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, p. 829–938, 2002.

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

FAN, H.Y.; SUN, Q.Y. Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. **Biol Reprod**, v. 70, p. 535–47, 2004.

FERGUSON, E.M.; LEESE, H.J. A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 1195–1201, 2006.

FERREIRA, E.M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836–848, 2009.

Food and Agriculture Organization – FAO. Agricultural production, **Livestock Primary**, 2016.

FULKA-JR, J.; FIRST, N.L.; MOOR, R.M. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. **Mol Hum Reprod**, v. 4, p. 41–9, 1998.

GAVIN, A.C.; SCHORDERET-SLTKINE S. Ribosomal S6 kinase p90rsk and mRNA cap-binding protein eIF4E phosphorylations correlate with MAP kinase activation during meiotic reinitiation of mouse oocytes. **Mol Reprod Dev**, v. 46, p. 383–391, 1997.

GENICOT, G.; LEROY, J.L.; SOOM, A.V.; DONNAY, I. The use of a fluorescent dye, **Nile red**, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. **Theriogenology**, v.63, p. 1181-1194, 2005.

GREENSPAN, P.; FOWLER, S. D. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. **J Lipid Res**, v. 26, p 781-789, 1985.

HASHIMOTO S. Application of in vitro maturation to assisted reproductive technology. **Journal of Reproduction and Development**, v. 55, p. 1–10, 2009.

HOLT, J.E.; LANE, S.I.R.; JONES, K.T. The Control of Meiotic Maturation in Mammalian Oocytes. **Elsevier Inc.**, v. 102, p. 207–226, 2013.

HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote**, v. 5, p. 371–6, 1997.

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

HYTTEL, P.; XU, K.P.; SMITH, S.; GREVE, T. Ultrastructure of in vitro oocyte maturation in cattle. **J Reprod Fertil**, v. 78, p. 615–25, 1986.

IGOSHEVA, N.; ABRAMOV, A.Y.; POSTON, L.; ECKERT, J.J.; FLEMING, T.P.; DUCHEN, M.R.; MCCONNELL, J. Maternal diet-induced obesity alters mitochondrial activity and redox status in mouse oocytes and zygotes. **PLoS ONE**, v. 5, p. 100, 2010.

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

KIM, N.-H. et al. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during in vitro maturation. **Zygote**, v. 8, n. 1, p.25-32, 2000.

KLINE D. Attributes and dynamics of the endoplasmic reticulum in mammalian eggs. **Curr Top Dev Biol**, v. 50, p. 125–54, 2000.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 132, p. 191-206, 2006.

KOL, S.; ADASHI, E. Y. Intraovarian factors regulating ovarian function. **Obstetrics and Gynecology**, v. 7, p. 209-213, 1995.

KRISCHEK, C.; MEINECKE, B. In vitro maturation of bovine oocytes requires polyadenylation of mRNAs coding proteins for chromatin condensation, spindle assembly, MPF and MAP kinase activation. **Animal Reproduction Science**, v. 73, n. 3–4, p. 129–140, 2002.

KRISHER, R.L.; BAVISTER, B.D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v. 59, p. 103–14, 1998.

KRUIP A. M. et al. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo Article. **Gamete Research**, v. 8, p. 29 – 47, 1983.

LEROY, J. L.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; GOOVAERTS, I.G.; BOLLS, P.E. . Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. **Reprod Domest Anim**, v. 43, p. 612-622, 2008.

LEROY, J.L.; GENICOT, G.; DONNAY, I.; VAN SOOM, A. Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with Nile red: a practical approach. **Reprod. domest. anim.**, v. 40, p. 76-78, 2005.

LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; ROBERTS, T.H.; HIRSHBERG, K. Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 16, p. 557–89, 2000.

LODDE, V. et al. Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 5, p. 915–924, 2008.

LODDE, V. et al. **Oocytes**. Cham: Springer International Publishing, v. 63, 2017.

MACAULAY, A.D. et al. The gametic synapse: RNA transfer to the bovine oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 91, p. 90, 2014.

MACHACA, K. Ca<sup>2+</sup> signaling differentiation during oocyte maturation. **J Cell Physiol**, v. 213, p. 331–40, 2007.

MALHOTRA, J. D.; KAUFMAN, R. J. Endoplasmic Reticulum stress and oxidative stress: A vicious cycle or a double-edged sword?. **Antiox and Redox Signaling**, v. 9, p. 2277-2293, 2007.

MEHLMANN, L.M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, v. 130, p. 791–799, 2005.

NAGANO, M. Acquisition of developmental competence and in vitro growth culture of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 65, p. 195–201, 2019.

NOGUEIRA, D.; ALBANO, C.; ADRIAENSSENS, T.; CORTVRINDT, R.; BOURGAIN, C.; DEVROEY, P.; SMITZ, J. Human oocytes reversibly arrested in prophase I by phosphodiesterase type 3 inhibitor in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1042–1052, 2003.

O’GORMAN, A. O.; WALLACE, M.; COTTELL, E.; GIBNEY, M. J.; MCAULIFFE, F. M.; WINGFIELD, M.; RENNEN, L. Metabolic Profiling of Human Follicular Fluid Identifies Potential Biomarkers of Oocyte Developmental Competence. **Reprod**, v. 146, p. 389-39, 2013.

OHSAKI, Y.; SUZUKI, M.; AND FUJIMOTO, T. Open questions in lipid droplet biology. **Chem Biol**, v. 21, p. 86–96, 2014.

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

PACZKOWSKI, M.; SILVA, E.; SCHOOLCRAFT, W.B.; KRISHER, R.L. Comparative importance of fatty acid  $\beta$ -oxidation to nuclear maturation, gene expression, and glucose metabolism in mouse, bovine, and porcine cumulus–oocyte complexes. **Biology of Reproduction**, v. 88, p. 111, 2013.

PARK, J.Y. et al. EGF-Like Growth Factors as Mediators of LH Action in the Ovulatory Follicle. **Science**, v. 303, n. 5658, p. 682–684, 2004.

QUINLAN, M. E. Direct interaction between two actin nucleators is required in *Drosophila* oogenesis. **Development**, v. 140, p. 4417-4425, 2013.

ROBKER, R. L. et al. Obese Women Exhibit Differences in Ovarian Metabolites, Hormones, and Gene Expression Compared with Moderate-Weight Women. **J Clin Endocr Metab**, v. 94, p. 1533–1540, 2009.

SHIM, C.; LEE, S.G.; SONG, W.K.; LEE, C.S.; LEE, K.K.; KIM, K. Laminin chain-specific gene expression during mouse oocyte maturation. **Mol Reprod Dev**, v. 48, p. 185–193, 1997.

SHOUBRIDGE, E. A.; WAI, T. Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte. **Curr Top Dev Biol**, v. 77, p. 87-111, 2007.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, p. 126–36, 2006.

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

SPINDLER, R.E.; PUKAZHENTHI, B.S.; WILDT, D.E. Oocyte metabolism predicts the development of cat embryos to blastocyst in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 56, p. 163–171, 2000.

SPRÍCIGO JF, DIÓGENES MN, LEME LO, GUIMARÃES AL, MUTERLLE CV, SILVA BD, SOLÀ-ORIOLO D, PIVATO I, SILVA LP, DODE MA. Effects of Different Maturation Systems on Bovine Oocyte Quality, Plasma Membrane Phospholipid Composition and Resistance to Vitrification and Warming. **PLoS One**, 2015.

SPRICIGO, J.F.; SENA NETTO, S.B.; MUTERLLE, C.V.; RODRIGUES, S.D.E.A.; LEME, L.O.; GUIMARAES, A.L.; CAIXETA, F.M.; FRANCO, M.M.; PIVATO, I.; DODE, M.A. Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 86, p. 2054-2062, 2016.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P.B., et al. 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. **Biol Reprod**, v. 64, p. 904–909, 2001.

STRICKER SA. Structural reorganization of the endoplasmic reticulum during egg maturation and fertilization. **Sem Cell Dev Biol**, v.17, pág.303–13, 2006.

STURMEY, R. G.; LEESE, H. J. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. **Reproduction**, v. 126, p. 197-204, 2003.

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

SUDANO, M. J.; CAIXETA, E. S.; PASCHOAL, D. M.; MARTINS, A., JR.; MACHADO, R.; BURATINI, J.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. **Reproduction, fertility, and development**, v. 26, p. 1129-41, 2014.

SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D. M.; RASCADO, T. S.; MAGALHÃES, L. C. O.; CROCOMO, L. F.; LIMA-NETO, J. F.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v. 75, p. 1211–1220, 2011.

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. **Reprod Dom Anim**, v. 41, p. 5–11, 2006.

THACH, R.E. Cap recap: the involvement of the eIF-4F in regulating gene expression. **Cell**, v. 68, p. 177–180, 1992.

TOMEK, W.; TORNER, H.; KANITZ, W. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. **Reprod Dom Anim**, v. 37, p. 86–91, 2001.

TRIPATHI, A.; KUMAR, K.V.P.; CHAUBE, S.K. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. **Journal of Cellular Physiology**, v. 223, n. 3, p.592-600, 2010.

TURNER, N.; ROBKER, R. L. Developmental Programming of Obesity and Insulin Resistance: Does Mitochondrial Dysfunction in Oocytes Play a Role?. **Mol Hum Reprod**, v, 21, p. 23-30, 2014.

United States Department of Agriculture - USDA. Livestock, Dairy, and Poultry Outlook. **Economic Research Service**, 2019.

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

VAN HOECK, V.; STURMEY, R. G.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; LEESE, H. J.; BOLS, P. E. J.; LEROY, J. L. M. R. Elevated Non-Esterified Fatty Acid Concentrations During Bovine Oocyte Maturation Compromise Early Embryo Physiology. **PLoS One**, v. 6, p. 23183, 2011.

VIANA, J. Statistic of embryos production and transfer in domestic animals. A publication of International Embryo Technology Society (IETS), **Embryo Technology Newsletter**, v. 36, p. 8-19, 2018.

WEBB, R.J.; MARSHALL, F.; SWANN, K.; CARROLL, J. Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in [cAMP] and protein kinase a in mammalian oocytes. **Dev Biol.**, v. 246, p. 441–54, 2002.

WU LL, DUNNING, K.R.; YANG, X.; RUSSELL, D.L.; LANE, M.; NORMAN, R.J.; ROBKER, R.L. High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus–oocyte complexes and decreased fertilization rates. **Endocrinology**, v. 151, p. 5438–5445, 2010.

WU LL, RUSSELL, D.L.; NORMAN, R.J.; ROBKER, R.L. Endoplasmic reticulum (ER) stress in cumulus–oocyte complexes impair pentraxin-3 secretion, mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ), and embryo development. **Molecular Endocrinology**, v. 26, p. 562–573, 2012.

YANG, X.; DUNNING, K.R.; WU LL, HICKEY, T.E.; NORMAN, R.J.; RUSSELL, 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.

YEO, C.; GILCHRIST, R. B.; LANE, M. Disruption of bidirectional oocyte-cumulus paracrine signaling during in vitro maturation reduces subsequent mouse oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 1072-1080, 2009.

ZHANG, M.; SU, Y.Q.; SUGIURA, K.; WIGGLESWORTH, K.; XIA, G.; EPPIG, J.J. Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. **Endocrinology**, v.152, p. 4377–4385, 2011.

## Capítulo 2

## RESUMO

Trabalhos recentes têm demonstrado que a maturação *in vitro* (MIV) acarreta um maior acúmulo de lipídios no ovócito, o que se reflete na qualidade dos embriões produzidos. Esse acúmulo pode ser devido a retirada prematura dos ovócitos dos folículos ou ao ambiente *in vitro* propriamente dito, já que não ocorre quando os ovócitos são maturados *in vivo*. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de três sistemas de maturação: *in vitro* (MatV), *in vivo* (MatS) e Transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI; MatT), no acúmulo de lipídios em ovócitos bovinos. Os ovócitos foram maturados, em seus respectivos sistemas de maturação, por vinte e duas horas e, apenas os ovócitos com a presença do corpúsculo polar foram utilizados para as análises. A presença e quantificação de lipídios foi realizada pela coloração com Bodipy 493/503 em Microscopia Confocal e por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Foi também avaliada a expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídios por PCR em tempo real (qPCR) (*Acyl-CoA Synthetase Short Chain Family Member 2*, ACSS2; *Fatty Acid Elongase 1*, ELOVL1; *Fatty Acid Binding Protein 3*, FABP3). Dados relativos à cinética de maturação nuclear, quantificação do acúmulo de gotas lipídicas e expressão gênica, foram analisados pelo teste Qui-quadrado, ANOVA (GLIMMIX) e Kruskal-Wallis, respectivamente. Para todas as análises um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) foi considerado. A média da área ocupada pelos lipídios nos ovócitos imaturos (IMA;  $13\% \pm 1,9$ ) foi similar ( $p > 0,05$ ) aos ovócitos maturados *in vivo* (MatS=  $16\% \pm 1,7$  e MatT=  $12\% \pm 1,9$ ). Entretanto, nos ovócitos maturados *in vitro* (MatV), houve um aumento no acúmulo de lipídios ( $24\% \pm 1,9$ ) durante a maturação sendo maior do que nos outros grupos ( $p < 0,001$ ). Na avaliação ultraestrutural os ovócitos MatV apresentaram uma maior presença de lipídios. Contudo, todos os grupos foram semelhantes quanto a organização dos grânulos corticais e mitocôndrias. A expressão dos genes ACSS2, ELOVL1 e FABP3 foram semelhantes entre os grupos MatT e MatS ( $p > 0,05$ ), contudo, os ovócitos MatS também foram semelhantes ( $p > 0,05$ ) aos MatV. Pela primeira vez, foi demonstrado que ovócitos maturados pela TIFOI são semelhantes aos ovócitos maturados *in vivo*, quanto

ao acúmulo de lipídios, o que implica na superior qualidade quando comparado com os *in vitro*. Este novo método de maturação abre novas possibilidades para as biotecnologias que necessitam da maturação de ovócitos como a PIVE, criopreservação de ovócitos e embriões, clonagem e transgenia.

Palavras chave: Lipídios; Maturação *in vitro*; Maturação *in vivo*; Ovócitos; TIFOI

## ABSTRACT

Recent studies have shown that in vitro maturation (IVM) causes a greater accumulation of lipids droplets in the oocyte, which will affect the lipids content of the future embryo. This accumulation can be due to the premature removal of the oocytes from their follicles or to the in vitro environment itself, since it does not occur when the oocytes are matured in vivo. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of three maturation systems: in vitro (MatV), in vivo (MatS) and Intrafollicular transfer of immature oocytes (IFIOT; MatT), on the accumulation of lipids droplets in bovine oocytes. Oocytes were matured in the different maturation systems for 22h and only oocytes presenting a polar body were used for the analyzes. The presence and quantification of lipids was performed by Confocal Microscopy (Bodipy 493/503) and Transmission Electron Microscopy (TEM). The expression of genes related to lipid metabolism (Acyl-CoA Synthetase Short Chain Family Member 2, ACSS2; Fatty Acid Elongase 1, ELOVL1; Fatty Acid Binding Protein 3, FABP3) was quantified by real-time PCR (qPCR). Data related to nuclear maturation kinetics, quantification of lipid droplets and gene expression, were analyzed using the Chi-square test, ANOVA (GLIMMIX) and Kruskal-Wallis, respectively. For all analyzes, a significance level of 5% ( $p < 0.05\%$ ) was considered. The area occupied by lipids droplets in immature oocytes (IMA=13%  $\pm$  1.9) was similar ( $p > 0.05\%$ ) to oocytes matured in vivo (MatS = 16%  $\pm$  1.7 and MatT = 12%  $\pm$  1.9). However, in oocytes matured in vitro (MatV), there was an increase in the accumulation of lipids droplets (24%  $\pm$  1.9), being higher than in the other groups ( $p < 0.001$ ). In the ultrastructural evaluations, MatV oocytes also showed the highest lipids content. However, all groups were similar in organization of cortical granules and mitochondria. The expression of ELOVL1 and FABP3 genes were similar between oocytes matured by superstimulation treatment (MatS) and IFIOT ( $p > 0.05\%$ ). However, transcripts level for ACSS2 gene was lower in IFIOT oocytes than in MatV oocytes, being the MatS oocytes similar to oocytes from both groups. For the first time, it was shown that oocytes matured by IFIOT are similar to those matured in vivo, regarding to lipid accumulation, which indicates better quality when

compared to the in vitro. This new maturation system opens up new possibilities for biotechnologies that require the maturation of oocytes such as IVF, cryopreservation of oocytes and embryos, cloning and transgenics.

Keywords: Lipids; in vitro Maturation; in vivo Maturation; Oocytes; IFIOT

## INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais países responsáveis pela a produção de alimentos no mundo, sendo hoje o segundo maior produtor e o maior exportador de carne bovina (USDA, 2019). Em relação à produção leiteira, produz cerca 34,23 milhões de toneladas, anualmente, e se encontra em quarto lugar no ranking mundial. Apesar dos resultados expressivos, que refletem significativamente na economia brasileira, a eficiência de produção tanto de carne quanto de leite, ainda é baixa, quando comparado com outros países. A taxa de desfrute brasileira, por exemplo, é inferior à dos EUA e Austrália (ABIEC, 2018). Além disso, a total produção leiteira brasileira representa apenas 15% do que é produzido pelos EUA (FAO, 2016).

As projeções de demanda de alimentos oriundos da carne, leite, e seus respectivos derivados, para os próximos 20 anos, é estimada em um aumento de 20% (EMBRAPA, 2018). Para atender esta necessidade, uma das alternativas é intensificar os sistemas de produção com o uso de biotecnologias. Dentre as alternativas para aumentar a produtividade do rebanho bovino é a produção de embriões, pois, permite o acasalamento entre os animais de melhor qualidade zootécnica gerando, de uma maneira mais acelerada, um maior número de descendentes geneticamente “superiores”.

Cerca de 66% dos embriões produzidos, no mundo, são de origem in vitro (PIVE), sendo que desses, aproximadamente 1/3 são produzidos no Brasil. Esses dados mostram o importante papel do país no cenário mundial quanto ao uso dessa tecnologia. De fato, dos embriões produzidos no Brasil atualmente, 92% são oriundos de PIVE (Viana et al., 2018).

Apesar de bem estabelecida e difundida, a técnica ainda possui algumas limitações. Apenas 40 a 50% dos ovócitos submetidos ao processo de maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo in vitro (CIV), conseguem atingir o estágio de blastocisto (Sprícigo et al., 2015; Nagano, 2019). Além disso, embriões produzidos no sistema in vitro possuem menor resistência a criopreservação e menor capacidade de estabelecer uma

gestação, quando comparados com embriões produzidos *in vivo* (Farin et al., 1995; Aksu et al., 2012; Sudano et al., 2014). Essa pior qualidade e maior crio-sensibilidade parece ser devido ao elevado conteúdo lipídico presente nos embriões PIVE.

A presença de lipídios intracelulares é importante em ovócitos e embriões, para a homeostasia energética, proteção celular, regulação do metabolismo proteico e função nuclear. Entretanto, o cultivo *in vitro* afeta a quantidade, composição, tamanho e outras propriedades dos lipídios que podem afetar o potencial de desenvolvimento e, principalmente, a abundância de lipídios (Amstislavsky et al., 2018).

A maioria dos estudos nessa área, tem focado no efeito do cultivo embrionário na quantidade de lipídios de embriões bovinos, contudo, trabalhos recentes têm demonstrado que a MIV também induz a um maior acúmulo de lipídios no ovócito, mesmo na ausência de soro fetal bovino (SFB) (Aardema et al., 2011; Del Collado et al., 2016). Por outro lado, quando a maturação do ovócito ocorre dentro do folículo, *in vivo*, este fenômeno não é observado (Del Collado et al., 2016). Sugerindo que esse efeito pode ser devido ou a retirada prematura dos ovócitos do folículo ou ao tipo de ambiente onde a maturação é realizada.

Recentemente, foi relatada uma terceira opção para se produzir embriões bovinos, através da Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI) (Sprícigo et al., 2016). Dentre as vantagens desta técnica, se destaca a possibilidade de realizar todas as etapas da produção de embriões, inclusive a maturação, completamente *in vivo*, proporcionando mais uma ferramenta para os estudos da maturação ovocitária.

Assim, o presente estudo visou avaliar se ovócitos retirados prematuramente do folículo, mas maturados em ambiente *in vivo*, utilizando a TIFOI, apresentam o mesmo acúmulo de lipídios que os maturados *in vivo*. Para isso ovócitos bovinos maturados *in vitro*, maturados *in vivo* após superestimulação ovariana e maturados *in vivo* após TIFOI, foram comparados quanto a características moleculares, morfológicas e funcionais.

## DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O objetivo deste estudo foi avaliar características relacionadas ao acúmulo de lipídios em ovócitos maturados em três sistemas diferentes: *in vitro*, *in vivo* por superestimulação ovariana (SOV) e *in vivo* por TIFOI. Entretanto, antes de iniciar os experimentos alguns aspectos relacionados a maturação dos ovócitos pela técnica da TIFOI precisariam ser esclarecidos. O primeiro questionamento foi se o tempo em que os ovócitos permaneciam dentro do folículo seria suficiente para completarem a meiose. O outro foi relacionado a retomada da meiose, pois, considerando que para realizar a TIFOI os ovócitos seriam aspirados, selecionados e depois transferidos para o folículo, era importante que eles não retomassem a meiose antes que a TIFOI fosse realizada.

### ***Experimento 1 - Avaliação da maturação nuclear de ovócitos bovinos submetidos à TIFOI (MatT)***

O objetivo deste experimento foi avaliar se o período de vinte duas horas no folículo, após indução da ovulação com GnRH, seria adequado para os ovócitos completarem a maturação nuclear. Além disso, para garantir que os ovócitos não retomem a meiose espontaneamente, entre o período de aspiração, lavagem e TIFOI, foi testado o uso de um inibidor da fosfodiesterase 3 no meio de aspiração folicular.

Inicialmente, 25 ovócitos bovinos, com homogeneidade do citoplasma e pelo menos três camadas de células dos cumulus, oriundos de ovários de abatedouros, foram injetados em um folículo dominante (acima de 10mm) em animais previamente sincronizados, que receberam uma injeção intramuscular de análogo de GnRH (50µg de Lecirelina; Gestran®). Após 22 horas da injeção, os ovócitos foram recuperados por OPU. Imediatamente após a recuperação, os ovócitos foram desnudados, fixados, corados e avaliados em microscopia de contraste de fase (Nikon Eclipse E200, 1,000X) para identificar o estágio da meiose. Foram avaliados ovócitos imaturos (controle 0 horas; CT 0), ovócitos maturados *in*

*vitro* (controle 22 de maturação horas; CT 22) e ovócitos maturados *in vivo* pela TIFOI por 22 horas (TIFOI 22). Foram realizadas três réplicas consecutivas.

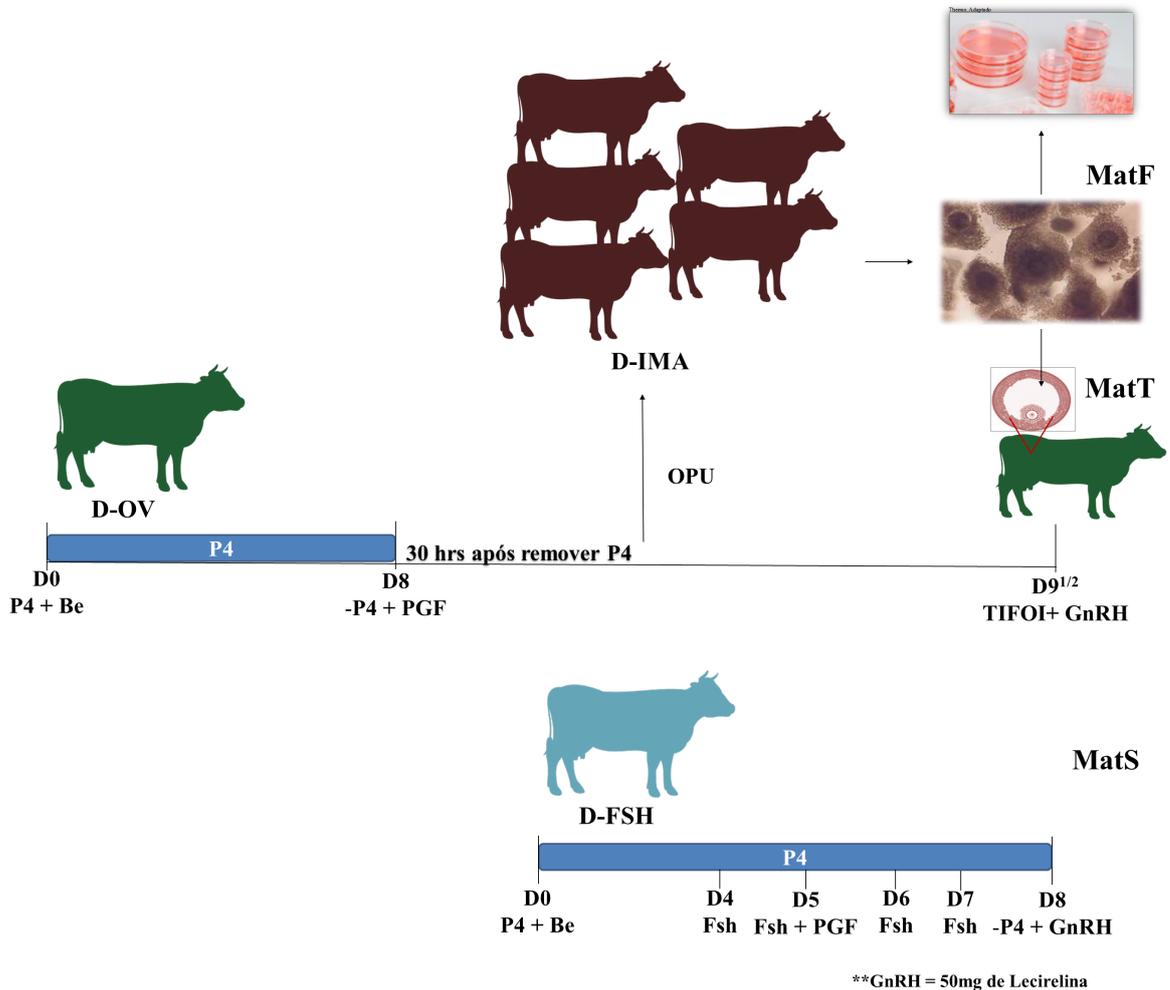
Na segunda parte do experimento, doadoras Nelore foram submetidas a OPU. Na metade dos animais o meio de aspiração utilizado foi suplementado de 500  $\mu\text{M}$  de IBMX. Após a lavagem e seleção, utilizando o mesmo meio, os complexos cumulus ovócitos (CCOs) permaneceram neste meio por um período de 8 horas, sob placa aquecedora, à 37°C. Ao término deste período, os ovócitos foram desnudados, fixados e corados com Lacmóide para avaliação do estágio da meiose. Foram avaliados ovócitos aspirados em meio com inibidor (IBMX 8) e sem inibidor (controle 8 horas de OPU; CT 8).

### ***Experimento 2. – Avaliação do Acúmulo de lipídios em ovócitos bovinos durante a maturação em diferentes sistemas.***

Para avaliar o efeito do sistema de maturação em características relacionadas ao acúmulo de lipídios, foram utilizados ovócitos bovinos oriundos de OPU. Um total de 90 novilhas Nelore foram utilizadas para compor três diferentes grupos: doadoras de ovócitos imaturos (D-IMA), ovuladoras (D-OV), e doadoras superestimuladas (D-FSH). Em cada réplica, quarenta animais eram preparados para o experimento: 20 animais para o grupo D-IMA, 10 animais para D-OV e 10 animais para D-FSH. Durante o experimento, todos os animais passaram por todos os grupos, sendo que, os que recebiam a superestimulação para compor o grupo D-FSH, aguardavam pelo menos cento e vinte dias para retornar ao experimento. Três sistemas de maturação foram avaliados: Maturação *in vitro* (MatV), Maturação *in vivo* (MatS), através da superestimulação ovariana, e Maturação *in vivo* pela TIFOI (MatT).

Em cada réplica, vinte novilhas Nelore do grupo D-IMA eram submetidas à OPU com meio suplementado com 500  $\mu\text{M}$  de IBMX. Os ovócitos recuperados eram distribuídos em dois grupos: MatV e MatT. Simultaneamente ao dia de aspiração e injeção (TIFOI), os animais superestimulados (D-FSH) foram induzidos com GnRH. Após vinte duas horas de maturação, nos respectivos grupos, os animais que receberam a TIFOI e FSH foram submetidos à OPU para a recuperação dos ovócitos maduros e, os ovócitos MatV, foram retirados do sistema de cultivo. Os ovócitos, de todos os grupos, foram completamente desnudados e, somente os que apresentaram a extrusão do primeiro corpúsculo polar, foram utilizados para os experimentos. Os ovócitos recuperados foram distribuídos e destinados para

três diferentes avaliações, sendo elas avaliação da quantificação de lipídios, microscopia eletrônica de transmissão e expressão gênica.



**Figura 3.** Esquema representativo do delineamento experimental. No dia 0 do protocolo de sincronização as Ovuladoras (D-OV) recebem um implante intravaginal de progesterona (P4) e a aplicação (i.m.) de 2mg de Benzoato de estradiol. No dia 2 do protocolo das D-OV, iniciava-se o protocolo (D0) das doadoras superestimuladas, com o mesmo procedimento das D-OV. No D4 das D-FSH iniciava-se, de 12 em 12 horas, a superestimulação ovariana. No D8 do protocolo das D-OV, retirava-se o P4 e administrava (i.m.) 500µg de Cloprostenol sódico. Vinte e quatro horas após a retirada de P4 (D-OV), as doadoras de ovócitos imaturos (D-IMA) eram aspiradas com meio suplementado de 500µm de IBMX. Os ovócitos eram rastreados e selecionados e, após isso, submetidos para a maturação in vitro (MatV) ou para a maturação TIFOI (MatT). Simultâneo à TIFOI, era realizado a indução da ovulação com 50mg de Lecirelina. No mesmo instante, as D-FSH também eram induzidas, para que, após 22 horas, fosse possível coletar os ovócitos de todos os sistemas de maturação.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Reprodução Animal (LRA) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF e no Campo Experimental Sucupira (CES), Riacho Fundo I-DF. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as leis brasileiras para a ética animal e pesquisa em saúde, aprovados pelo Comitê de Experimentação e Uso Animal (CEUA) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob o protocolo (004/2019).

A menos que indicado, todos os reagentes utilizados nos experimentos foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

### *Animais*

Foram utilizadas noventa novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), com escore de condição corporal semelhante (2.5 a 3, escore de 1 a 5), em regime de pastejo, sal mineral e água ad libitum. Os experimentos foram executados entre abril a agosto de 2019. Animais que estavam ciclando e sem nenhuma anormalidade aparente no sistema reprodutivo foram selecionados para os experimentos.

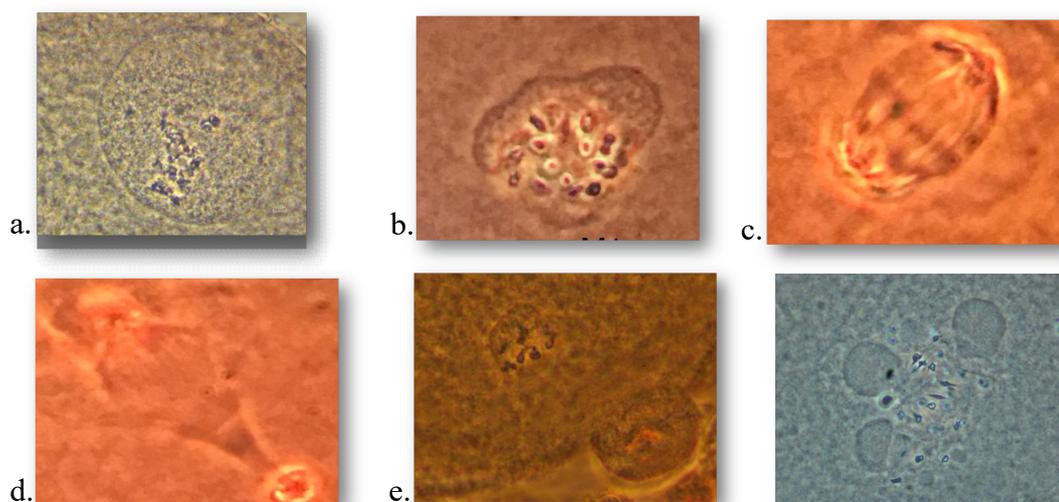
### *Obtenção de ovócitos Imaturos*

Para o Experimento 1, ovários de fêmeas bovinas foram coletados de abatedouros locais imediatamente após o abate. Esses foram transportados para o laboratório em solução salina 0,9% (NaCl), suplementado com antibióticos (estreptomicina - 100µg/ml e penicilina G - 100 UI/ml) à temperatura de 35-36°C. No laboratório, os folículos com diâmetro de 3,0–8,0 mm foram aspirados com seringa de 10 ml e agulha de calibre 18 G. O material aspirado foi então depositado em tubos plásticos de 15 ml. Após a sedimentação, foi

retirado o sobrenadante de líquido folicular, e, esse foi utilizado para a procura e seleção dos complexos cumulus ovócitos (CCOs). Apenas os CCOs com homogeneidade do citoplasma e pelo menos três camadas de células dos cumulus foram utilizados. Para os demais experimentos (2, 3 e 4), os ovócitos imaturos foram obtidos por aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU). O meio utilizado para a OPU foi adaptado de Bernal-Ulloa et al., (2016), consistindo de Solução tampão fosfato-salina (PBS) suplementado com 5% de BSA, 100 µg de Heparina Sódica (500 UI) e 500 µg de 3-isobutyl-methylxanthine (IBMX; diluído em 0.1% de Dimethyl Sulfoxide; DMSO). A procura e seleção dos ovócitos foi realizada nesse mesmo meio.

### ***Avaliação da maturação nuclear***

Para avaliação do estágio de maturação, os imaturos e maturados nos diferentes sistemas foram desnudados por repetidas pipetagens e fixados com etanol e ácido acético (2:1) por pelo menos 48 horas. Foram corados com solução de lacmoide 1% em ácido acético glacial 45%. A avaliação dos estágios da meiose foi realizada em microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse E200, 1,000X) e classificados em: vesícula germinativa (VG) vesícula germinativa rompida (GVBD); metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI), metáfase II (MII) e anormais (Figura 2). Ovócitos considerados anormais apresentavam a cromatina com alguma alteração ou que não era possível identificar o estágio.



**Figura 2.** Imagens representativas dos diferentes estágios da meiose dos ovócitos: (a) VG: vesícula germinativa; (b) MI: metáfase I; (c) AI: anáfase I; (d) TI: telófase I; (e) MII: metáfase II; (f) anormal.  
Fonte: Laboratório de Reprodução Animal (LRA)

### ***Maturação in vitro (MatV)***

Os CCOs selecionados foram lavados e transferidos em grupos de 25-30 ovócitos para gotas de 150  $\mu$ L de meio de maturação composto de TCM-199 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 4 mg/ml de BSA, 0,001 UI/mL de FSH, 10 mg/mL de L-glutamina, Cysteamina (0,1 $\mu$ M/mL), Piruvato de sódio (1 mM), e antibióticos (amicacina, 0,075 mg/mL), sob óleo mineral. Os COC's foram maturados por 22 horas a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, em ar.

### ***Maturação TIFOI (MatT)***

O procedimento para a realização da TIFOI foi de acordo com o descrito por Sprícigo et al., (2016). A sincronização das Ovuladoras (D-OV) para a Maturação TIFOI (MatT) consistiu em inserir um implante intravaginal de progesterona (1g; Sincrogest<sup>®</sup> Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil) associado à aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (RIC-BE<sup>®</sup>, Tecnopec Ltda, São Paulo, Brasil) no dia 0 (D0). Após 8 dias (D8), os animais receberam uma injeção de 2 mL de prostaglandina F2 $\alpha$  (500 $\mu$ g de Cloprostenol; ESTRON<sup>®</sup>, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) juntamente com a remoção do implante de progesterona. Trinta horas após a retirada do

implante (D9<sup>1/2</sup>), a injeção intrafolicular de 25 ovócitos imaturos foi realizada no folículo dominante (acima de 10 mm). Simultaneamente à TIFOI, foi administrado 50 µg de análogo de GnRH (Lecirelina; Gestran<sup>®</sup> ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina) e, vinte e duas horas após a injeção, o folículo pré ovulatório foi aspirado por OPU.

### ***Maturação in vivo (MatS)***

Para a maturação in vivo, doadoras de ovócitos (D-FSH) foram submetidas a um protocolo de superestimulação ovariana. No dia 0 (D0) da sincronização, os animais receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (1g; Sincrogest<sup>®</sup>) e 2 mg de benzoato de estradiol (RIC-BE<sup>®</sup>). Quatro dias mais tarde (D4), os animais foram superestimulados com 80 mg de FSH (Folltropin-V<sup>®</sup>; Vetoquinol N.-A. Inc, QC, Canadá) em doses decrescentes, recebendo duas aplicações por dia ao longo de quatro dias (12/12horas). A luteólise foi induzida com 500 µg de PGF2a (500µg de Cloprostenol; ESTRON<sup>®</sup>) e administrado junto à quinta aplicação de FSH. Doze horas após a última aplicação, o dispositivo de progesterona foi removido e administrado (i.m.) 50 µg de análogo de GnRH (Lecirelina; Gestran<sup>®</sup>) e, vinte e duas horas após a indução, os folículos maiores do que 8 mm foram aspirados.

### ***Recuperação de ovócitos maturados***

Após vinte duas horas de cultivo os ovócitos maturados in vitro foram retirados da estufa. Já os maturados in vivo (*TIFOI e SOV*) foram aspirados por OPU. Antes da aspiração, foi realizado exame de ultrassonografia para avaliar a resposta dos animais superestimulados (D-FSH) e a presença e tamanho do folículo nos animais selecionados para a TIFOI (D-OV). Para a recuperação dos ovócitos maturados in vivo, em folículos maiores que 8 mm, a pressão de vácuo foi ajustada para 30 ml/min. Após a OPU, os ovócitos recuperados eram selecionados, desnudados por sucessivas pipetagens, e avaliados para a presença do corpúsculo polar (CP). Apenas ovócitos com o CP foram utilizados para os experimentos.

### ***Coloração de Lipídios***

Os ovócitos desnudos foram fixados por uma hora em 4% de paraformaldeído, lavados 3 vezes em PBS e, estocados à 4°C em paraformaldeído a 1%. Após esse período de fixação, os ovócitos foram lavados duas vezes em PBS suplementado com 0,3% de polivinilpirrolidona (PVP), incubados por 30 minutos em PBS suplementado com 0,2% de Triton. Posteriormente, foram lavados mais três vezes em PBS com 0,3% de PVP e, então, corados com Bodipy 493/503 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (20 µg/mL, diluídos em 50 µl de etanol absoluto e 950 µl de PBS) durante uma hora. Logo após, foram lavados três vezes em PBS com PVP (0,3%), colocados individualmente em placas de 35 mm em gotas de 8µL de solução “anti fade” (SlowFade™; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) e levados ao microscópio confocal. No microscópio confocal Leica sp8 (Nova Orleans, LA, USA) foi usado o laser *Argon 488* em aumento de 20 x. Todos os ovócitos foram avaliados em uma mesma configuração de emissão e excitação, assim como para os cortes (a cada 2,96 µm), para a formação da imagem. Todas as imagens adquiridas foram avaliadas em uma função do programa ImageJ que permite calcular a área ocupada pelos lipídios em razão da área total do ovócito.

### ***PCR em tempo real (qPCR)***

O nível de transcritos de três genes relacionados ao metabolismo de lipídios: *Acyl-CoA Synthetase Short Chain Family Member 2*, *Fatty Acid Elongase 1* e *Fatty Acid Binding Protein 3* (ACSS2, ELOVL1, FABP3, respectivamente) foram avaliados por qPCR.

A qPCR foi realizado em 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, USA). Foram utilizados 4 pools de 16 ovócitos para cada tratamento. O RNA total foi isolado usando o Kit RNeasy Plus Micro (Quiagen®, Hilden, Germany), de acordo com instruções do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada usando GoScript (200 U/µL, Promega®, Wisconsin, USA) com *primers* (do inglês, oligonucleotídeo iniciador) Oligo-dT (0,5 µg/µL) e Random (0,5 µg/µL), adicionando as enzimas (transcriptase reversa e inibidor de ribonuclease recombinante) e tampão em um volume final de 3µL. As reações foram realizadas a 70 °C por 5 minutos, seguido de resfriamento por pelo menos 5 minutos; numa segunda etapa o anelamento ocorre à 25 °C por 5 minutos, e a extensão à 42 °C por 60 minutos, seguido pela inativação da enzima a 70 °C por 15 minutos.

A análise da qPCR foi realizada usando *GoTaq Master Mix* (Promega®). As reações foram otimizadas para promover eficiência de amplificação máxima para cada gene (80–110%) usando as curvas padrões relativas no programa 7500 2.0.3 (Applied Biosystems). Cada amostra foi analisada em triplicata e a especificidade de cada produto de PCR foi determinada pela análise da curva de *melting* e tamanho do *amplicon* em gel de agarose. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL usando cDNA correspondente a 0,73 ovócito. As condições dos ciclos do PCR foram 95 °C por 5 minutos, seguido de 50 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e então anelamento a 60 °C por 30 segundos.

A média geométrica do nível de expressão relativa de dois genes constitutivos, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) e  $\beta$ -Actina (ACTB), foi utilizada para normalização dos dados (Pfaffl, 2006). A expressão relativa de cada gene foi calculada usando o método de  $\Delta\Delta C_t$  com correção da eficiência pelo método (Pfaffl, 2001). O nome, a sequência e concentração do *primer*, tamanho do *amplicon* e temperatura de anelamento de cada gene estão listadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Informações sobre os primers específicos usados para análise da amplificação dos fragmentos dos genes pela qPCR.

Genes	Sequência dos Primers	Tamanho Amplicon (pb)	Concentração Primer (nM)	GeneBank Núm. Acesso /referência
<b>GAPDH</b>	F: GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA R: CCC TCC ACG ATG CCA AAG T	118	300	NM_001034034.2
<b>ACTB</b>	F: GGC ACC CAG CAC AAT GAA GAT CAA R: ATC GTA CTC CTG CTT GCT GAT CCA	126	300	XM_010845770.1
<b>FABP3</b>	F: ATC GTG ACG CTG GAT GGC GG R: GCC GAG TCC AGG AGT AGC CCA	210	200	NM_174313.2
<b>ACSS2</b>	F: TGC ACC TGG ATT GCC TAA AAC R: TTC ATT GGA TGG TCA AGC AGC	158	200	NM_001105339.1
<b>ELOVL1</b>	F: AGC CCT ACC TTT GGT GGA AA R: ACG AAG AAG ATG GTG CCG TA	160	200	NM_001034703.2

F: *primer forward*; R: *primer reverse*

### ***Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)***

Parte dos ovócitos imaturos e maturados nos diferentes sistemas, foi utilizada para avaliação morfológica através da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Os ovócitos foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M com pH 7,2 e, foram mantidos a 4°C por cerca de 24 horas. Após 3 lavagens com cacodilato 0,1M com intervalos de 10 minutos entre elas, seguiu-se a pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2. Foi feita a contrastação *in bloc* com acetato de uranila aquosa a 0,5% por 24 horas a 4°C. Lavou-se por 3x a cada 10 minutos com tampão cacodilato de sódio 0,1M. As amostras em seguida foram desidratadas em série crescente de etanol de 10% a 100%, com intervalos de 20 minutos, por 2 vezes cada etapa. Continuamente foi feita a infiltração com resina Epon 812<sup>®</sup> (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) pelo protocolo do fabricante. Os ovócitos foram incluídos em moldes próprios para polimerização a 70°C. Seções ultrafinas foram obtidas com 40 nm em grades de cobre cobertas com Formvar<sup>®</sup> (Structure Probe Inc., West Chester, PA, EUA) utilizando-se o ultramicrotomo Leica, contrastadas com acetato de uranila 5% por 1 hora, em condições escuras, sendo, então, analisadas e foto documentadas para as avaliações.

### ***Análise estatística***

Os dados relativos à cinética de maturação nuclear foram analisados pelo teste Qui-quadrado, os de quantificação do acúmulo de gotas lipídicas nos ovócitos por ANOVA usando o modelo misto linear generalizado (GLIMMIX) e os da expressão gênica o teste de Kruskal-Wallis. Para todas as análises um nível de significância de 5% ( $p < 0.05$ ) foi considerado.

## RESULTADOS

### *Experimento 1 - Avaliação da maturação nuclear de ovócitos bovinos submetidos à TIFOI (MatT)*

Para avaliar se na TIFOI, o período de vinte duas horas de maturação no folículo, após a indução da ovulação com GnRH, seria adequado para os ovócitos completarem a maturação nuclear, um total de 273 ovócitos foram avaliados, em 3 réplicas biológicas (Tabela 2). Os resultados demonstraram que em 22 horas de maturação, a percentagem de ovócitos que completaram a maturação nuclear foi semelhante ( $p > 0,05\%$ ) entre a o grupo maturado in vitro e o maturado TIFOI.

**Tabela 2** – Avaliação da maturação nuclear de ovócitos bovinos submetidos à Maturação por Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI; MatT) e dos maturados in vitro (controle).

Tratamento	N°	Estágios da Maturação Nuclear												Anormais	%
		VG	%	VGBD	%	MI	%	AI	%	TI	%	MII	%		
CT 0	81	80	98,76 <sup>a</sup>	0	0 <sup>b</sup>	0	0 <sup>b</sup>	0	0 <sup>b</sup>	0	0 <sup>b</sup>	0	0 <sup>b</sup>	1	1,23 <sup>a</sup>
CT 22	56	0	0 <sup>b</sup>	0	0 <sup>b</sup>	2	3,57 <sup>a</sup>	1	1,78 <sup>a</sup>	8	14,28 <sup>a</sup>	42	75 <sup>a</sup>	3	5,35 <sup>a</sup>
TIFOI 22	136	1	0,7 <sup>b</sup>	1	0,7 <sup>a</sup>	15	11,02 <sup>a</sup>	2	1,47 <sup>a</sup>	12	8,82 <sup>a</sup>	98	72,05 <sup>a</sup>	7	5,14 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística teste Qui-quadrado ( $P < 0,05$ )

\* VG: vesícula germinativa; VGBD: quebra da vesícula germinativa; MI: metáfase I; AI: anáfase I; TI: telófase I; MII: metáfase II

\*CT 0: ovócitos imaturos; CT 22: ovócitos maturados in vitro por 22 horas; TIFOI 22: ovócitos maturados por 22 horas no folículo.

Para garantir que os ovócitos não retomem a meiose espontaneamente, entre o período de aspiração, lavagem e TIFOI, foi testado o uso de um inibidor da fosfodiesterase 3

(IBMX) no meio de aspiração folicular. Um total de 231 ovócitos foram avaliados em 5 réplicas (Tabela 3). A suplementação do meio de aspiração com IBMX mostrou ser eficaz para inibir a retomada da meiose ( $p < 0,05\%$ ). Mais de 80% dos ovócitos retirados dos folículos, prematuramente, continuaram retidos em VG as após 8 horas da aspiração.

**Tabela 3** – Avaliação da maturação nuclear de ovócitos bovinos aspirados em meio suplementado com 3-isobutyl-methylxanthine (IBMX; 500  $\mu\text{M}$ ) e avaliados 8 horas após aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU).

Tratamento	N°	Estágios da Maturação Nuclear													
		VG	%	VGBD	%	MI	%	AI	%	TI	%	MII	%	Anormais	%
CT 8	112	23	20,53 <sup>a</sup>	88	78,57 <sup>a</sup>	1	0,89	0	0	0	0	0	0	0	0
IBMX 8	119	97	81,51 <sup>b</sup>	20	16,8 <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1,68

\*<sup>a,b</sup> representam diferenças estatísticas pelo teste Qui-quadrado ( $P < 0,05$ )

\* VG: vesícula germinativa; VGBD: quebra da vesícula germinativa; MI: metáfase I; AI: anáfase I; TI: telófase I; MII: metáfase II

\*CT 8: ovócitos avaliados 8 horas após à OPU sem inibidor; IBMX 8: ovócitos avaliados 8 horas após OPU em meio suplementado com inibidor da fosfodiesterase 3.

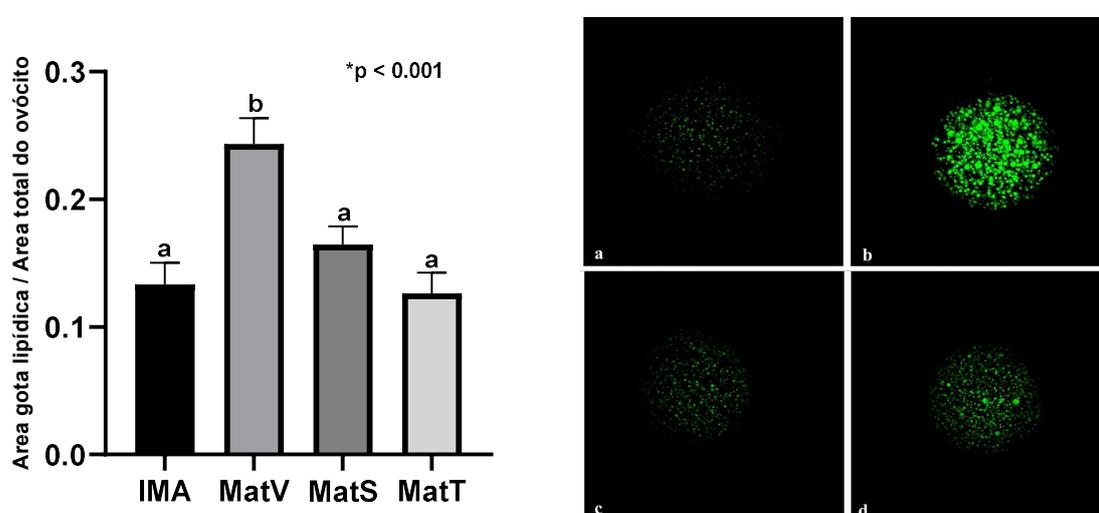
### ***Experimento 2: Avaliação do acúmulo de lipídios em ovócitos bovinos durante a maturação em diferentes sistemas***

Com a utilização de um corante específico para lipídios neutros (Bodipy 493/593) foi possível verificar, através da intensidade e quantidade de fluorescência no ovócito, o efeito dos sistemas de maturação no acúmulo de lipídios. Um total de 118 ovócitos foram avaliados: 32 ovócitos imaturos (CT), 26 maturados *in vitro* (MatV), 32 *in vivo* (MatS) e 28 *in vivo*, através da TIFOI (MatT). A média da área ocupada pelos lipídios nos ovócitos imaturos foi similar ( $p > 0,05\%$ ) aos ovócitos maturados *in vivo* e MatT. Todavia, nos ovócitos maturados *in vitro* (MatV) houve um aumento no acúmulo de lipídios durante a maturação e, esse grupo apresentou maior percentagem de lipídios do que todos os outros grupos ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 4** – Porcentagem da área ocupada pelos lipídios em razão da área total dos ovócitos maturados em diferentes sistemas.

	n	% Área gota lipídica	Desvio Padrão (%)
IMA	32	13,16 <sup>a</sup>	1,896
MatV	26	24,38 <sup>b</sup>	1,980
MatS	32	16,47 <sup>a</sup>	1,755
MatT	28	12,44 <sup>a</sup>	1,944

IMA: Ovócitos imaturos; MatV: Ovócitos maturados *in vitro*; MatS: Ovócitos maturados *in vivo*; MatT: Ovócitos maturados *in vivo* (TIFOI). Análise estatística realizada por ANOVA (GLIMMIX) ( $p < 0.001$ )

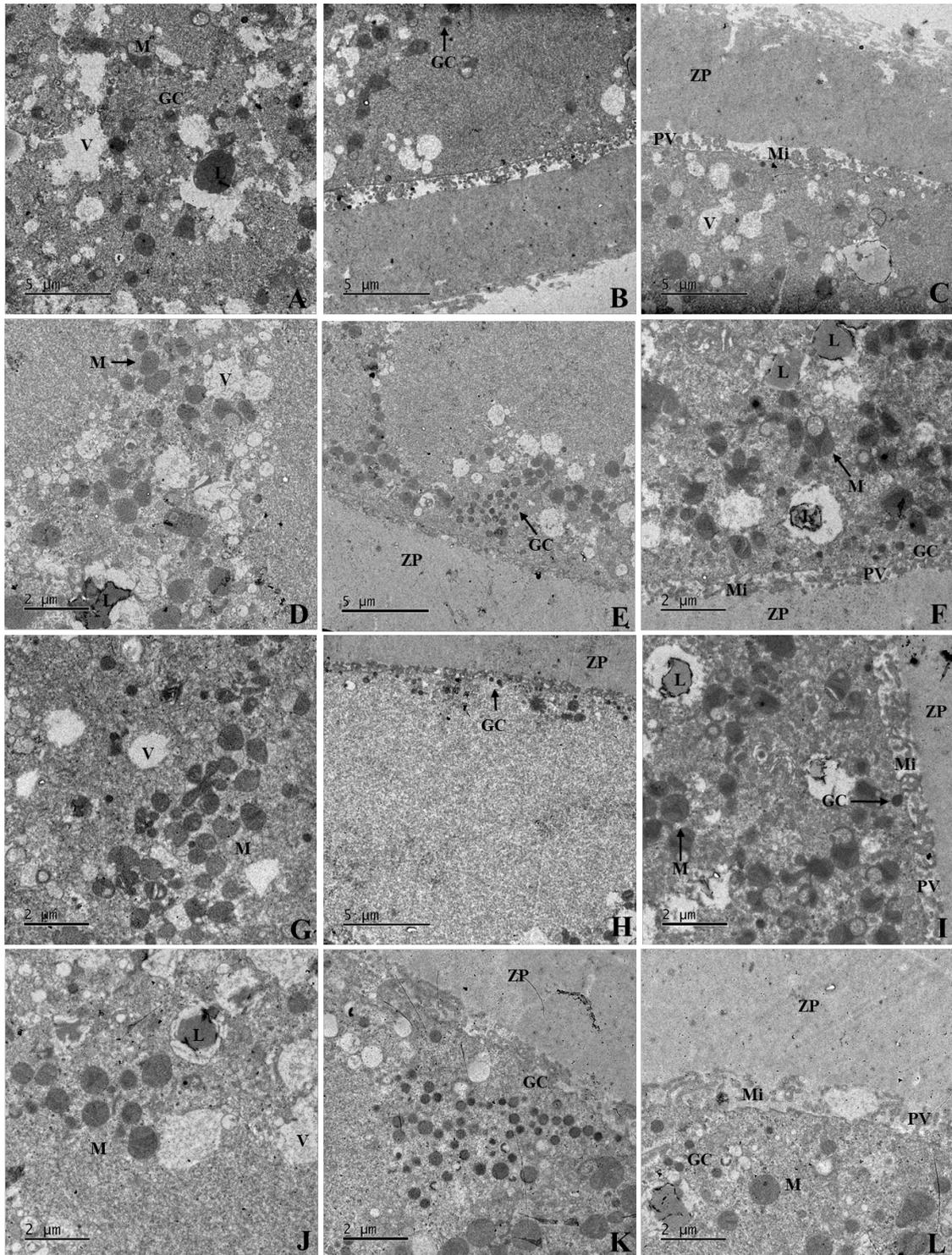


**Figura 4**– Gráfico: Área de gotas lipídicas em razão da área total dos ovócitos maturados em diferentes sistemas. Análise estatística realizada pelo teste de Tukey (GLIMMIX) ( $p < 0.001$ ). Imagem: microscopia confocal de ovócitos corados com Bodipy 493/503. a: ovócito imaturo (IMA); b: ovócito maturado *in vitro* (MatV); c: ovócito maturado *in vivo* (MatS); d: ovócito maturado pela TIFOI (MatT).

#### ***Avaliação ultraestrutural de ovócitos bovinos maturados em diferentes sistemas***

Ovócitos imaturos e os oriundos dos diferentes sistemas de maturação foram avaliados quanto a ultraestrutura por MET. O estado de preservação das estruturas foi confirmado com as análises das secções ultrafinas, que demonstraram a integridade da Zona Pelúcida (ZP), assim como as organelas presentes no ooplasma. Foi possível observar que os ovócitos imaturos apresentaram uma menor quantidade de gotas lipídicas (L), assim como as mitocôndrias (M), os quais se encontravam na região mais periférica do ooplasma (Fig. 4 –C). Após vinte e duas horas de maturação, em todos os grupos (MatV, MatS e MatT), pode se

observar a migração das mitocôndrias para a região central do ovócito, além de uma maior concentração, quando comparado com os ovócitos imaturos (Fig. 4 – D, F, G, I, J, K e L). Além disso, pôde-se notar o redirecionamento dos grânulos corticais (GC) para a periferia, próximos à zona pelúcida, e numerosas microvilosidades (Mi) no espaço perivitelínico (PV) dos ovócitos maduros (Fig. 4 – E, H, K). Em relação ao conteúdo lipídico observado, os ovócitos maturados no sistema *in vitro* (MatV) apresentaram uma maior presença de lipídios, quando comparado com todos os outros tratamentos (Fig. 4).

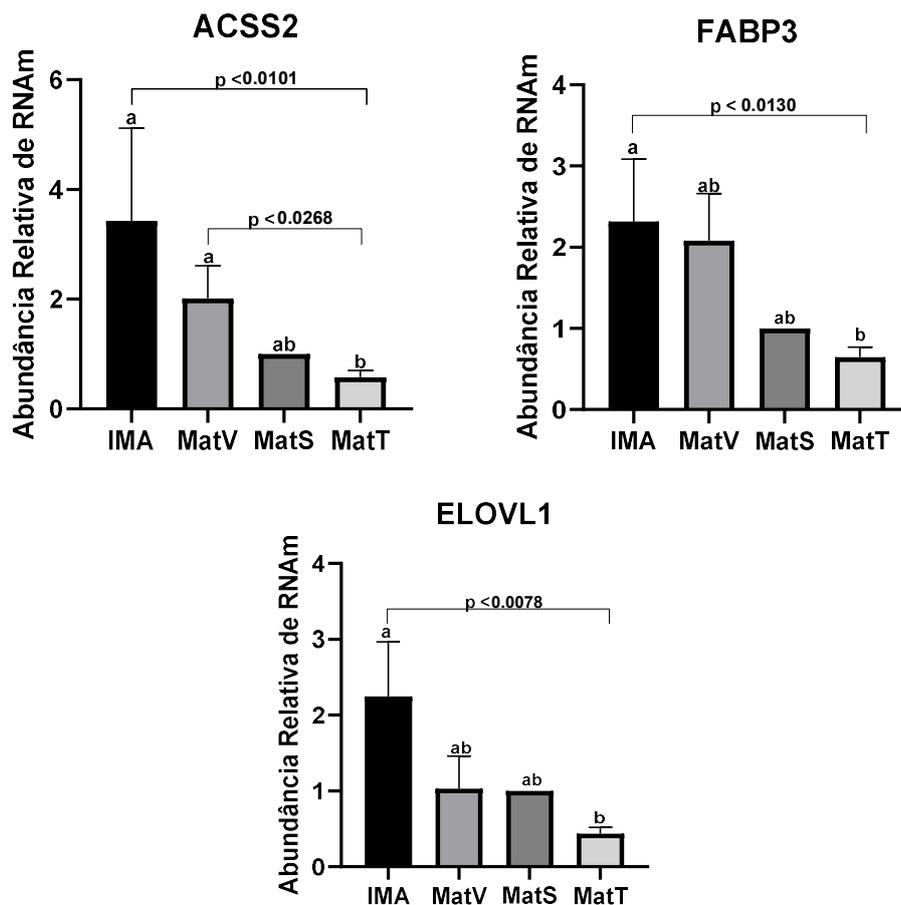


**Figura 5** – Avaliação ultraestrutural de ovócitos bovinos maturados em diferentes sistemas. A: ooplasmato de ovócito imaturo; B e C: periferia ovócito imaturo; D: ooplasmato ovócito maturado *in vitro* (MatV); E e F: periferia ovócito maturado *in vitro* (MatV); G: ooplasmato ovócito maturado *in vivo* (MatS); H e I: periferia ovócito maturado *in vivo* (MatS); J: ooplasmato ovócito maturado *in vivo*, pela TIFOI (MatT); K e L: periferia ovócito maturado *in vivo*, pela TIFOI (MatT). ZP: Zona Pelúcida; PV: Espaço Perivitelínico; GC: Grânulos Corticais; M: Mitocôndria; Mi: Microvilosidades; V: Vacúolo. IMA: Ovócitos imaturos; MatV: Ovócitos maturados *in vitro*; MatS: Ovócitos maturados *in vivo*; MatT: Ovócitos maturados *in vivo* (TIFOI).

### *Avaliação de genes relacionados com metabolismo de lipídeos em ovócitos*

Para determinar o nível de transcritos para os genes envolvidos com o metabolismo de lipídios em ovócitos bovinos, avaliou-se o perfil de expressão dos genes: ACSS2, ELOVL1, FABP3 em ovócitos imaturos e maduros, em seus respectivos sistemas de maturação: MatV, MatS e MatT.

Os resultados mostraram que o padrão de expressão dos genes ACSS2, ELOVL1 e FABP3 variaram durante a maturação ( $p < 0,05\%$ ). A expressão dos genes ACSS2, ELOVL1 e FABP3 foram semelhantes entre os grupos MatT e MatS ( $p > 0,05\%$ ), contudo, os ovócitos MatS também foram semelhantes ( $p > 0,05\%$ ) aos MatV. Importante ressaltar, o nível de transcritos de ACSS2 foi menor ( $p < 0,05\%$ ) nos ovócitos TIFOI (MatT) do que os maturados *in vitro* (MatV) (Figura 5).



**Figura 5** – Nível de transcritos dos genes ACSS2, ELOVL1, FABP3. Os dados (média  $\pm$  EP) foram normalizados pelos genes GAPDH e ACTB. IMA: Ovócitos imaturos; MatV: Ovócitos maturados *in vitro*; MatS: Ovócitos maturados *in vivo*; MatT: Ovócitos maturados *in vivo* (TIFOI)

## DISCUSSÃO

Estudos recentes mostraram que a maturação *in vitro* afeta o acúmulo de lipídios que ocorrem em embriões produzidos *in vitro*, independente do meio ou sistema em que os embriões são cultivados. Entretanto, pouco se sabe se esse acúmulo se deve a simples retirada dos ovócitos, prematuramente, dos folículos ou se é decorrente do ambiente que a maturação ocorre. Portanto, o presente estudo visou avaliar o que induz esse acúmulo, utilizando como ferramenta a TIFOI, que permite submeter os ovócitos a retirada prematura dos folículos, mas, a maturação dentro do folículo (Fleming et al., 1985; Bergfelt et al., 1998; Sprícigo et al., 2016). Para isso, o acúmulo de lipídios em ovócitos submetidos a diferentes sistemas de maturação (*in vivo*, *in vitro* e TIFOI) foi avaliado.

Primeiramente, foi necessário avaliar se o sistema de maturação TIFOI seria capaz de induzir a maturação nuclear dos ovócitos injetados dentro do folículo. Os resultados mostraram que 22 horas de maturação intrafolicular, após a indução da ovulação do folículo injetado, foram suficientes para que os ovócitos atingissem MII. Tanto que a taxa de ovócitos em MII nos maturados no folículo foram semelhantes ( $p > 0,05\%$ ) aos maturados *in vitro*. As taxas de maturação nuclear encontradas estão dentro do esperado, já que vários estudos também mostram taxas de MII ao redor 80% após 22 a 24 de maturação (Dominko & First, 1997; Bernal-Ulloa et al., 2016; Diógenes et al., 2017; Pavani et al., 2019).

O outro aspecto abordado foi a retomada da meiose, já que a simples remoção prematura, do ovócito do ambiente folicular ocasiona a retomada espontânea da meiose (Edwards, 1965). Considerando que os ovócitos a serem maturados na TIFOI, seriam aspirados das doadoras, selecionados e depois injetados, essa simples remoção dos folículos seria suficiente para que eles retomassem a meiose. Portanto, foi necessário avaliar o uso de um agente que bloqueasse os ovócitos em VG. Várias substâncias têm sido utilizadas para manter altos níveis de AMPc e inibir a retomada da meiose em ovócitos, entre elas estimuladores da Adenil ciclase e inibidores da fosfodiesterase (Albuz et al., 2010; Guimaraes et al., 2015; Caixeta et al., 2016; Diógenes et al., 2017). No presente estudo a IBMX foi selecionada por ser um inibidor da fosfodiesterase 3, específica do ovócito. A IBMX age

inibindo a fosfodiesterase 3, cuja função é degradar o AMPc intra ovocitário, mantendo-o retido em VG. Como esperado, a maioria dos ovócitos aspirados com meio suplementado com IBMX estavam em VG oito horas após a aspiração, enquanto aqueles aspirados sem a adição do inibidor estavam em VGBD. Desta forma, a suplementação do meio de aspiração com IBMX foi eficaz para inibir a retomada da meiose ( $p < 0,05\%$ ). Esses resultados estão de acordo com aqueles relatados por (Bernal-Ulloa et al., 2016) que, avaliando o uso de IBMX no meio de aspiração resultou em 70% de VG em novilhas pré-puberes. Esse resultado resolve um dos problemas do uso da TIFOI, visto que, os ovócitos coletados pela OPU, são impedidos da retomada prematura da meiose e ao envelhecimento.

Os ovócitos maturados nos diferentes sistemas foram, então, comparados quanto ao acúmulo de lipídios avaliando inicialmente a área ocupada pelos lipídios com auxílio de corante fluorescente. Os resultados mostraram, claramente, que os ovócitos maturados nos sistemas *in vivo* (superestimulação e TIFOI) foram semelhantes aos imaturos ( $p > 0,05\%$ ) e apresentaram um menor acúmulo quando comparado com os maturados no sistema *in vitro* ( $p < 0,001\%$ ). Esses dados corroboram com os relatos da literatura, que mostraram que ovócitos maturados *in vivo*, por superestimulação, possuem o conteúdo lipídico semelhante aos imaturos. Já os maturados *in vitro*, mostraram um aumento do conteúdo lipídico, mesmo na ausência do SFB no meio de maturação, o que também está de acordo com a literatura (Aardema et al., 2011; Del Collado et al., 2016). Com relação aos ovócitos maturados *in vivo*, pela TIFOI, os resultados mostraram características relacionadas com o acúmulo de lipídios semelhantes aos ovócitos maturados *in vivo*. Este é o primeiro estudo que utiliza a TIFOI para a maturação de ovócitos e, foi evidenciado que o cultivo *in vitro* é o fator responsável pelo acúmulo de lipídios que ocorre durante a maturação, já que esses ovócitos também foram retirados prematuramente do folículo. Além disso, também mostramos o acúmulo de gotas de lipídicas nos ovócitos maturados *in vitro*, mesmo na ausência de SFB. Durante muito tempo, o acúmulo de gotas lipídicas foi atribuído ao meio de cultivo. (Abe et al., 2002). Embora não esteja muito claro o que causa o acúmulo de lipídios, existem muitas evidências indicando que esse fato está diretamente relacionado à suplementação com SFB. No entanto, nossos resultados mostraram que, mesmo quando os ovócitos são submetidos ao meio com BSA, eles ainda apresentam mais acúmulo de lipídios do que os maturados *in vivo*.

Para confirmar essa diferença no acúmulo de lipídios e observar outras características relacionadas com a maturação ovocitária, os ovócitos também foram avaliados quanto a ultraestrutura. De acordo com os resultados já observados na fluorescência, na MET

os ovócitos maturados *in vitro* também apresentaram uma maior presença de lipídios, comparado com os sistemas de maturação *in vivo*. Outro aspecto observado na MET foi a localização dos GC, que se encontravam agrupados e dispostos por todo citoplasma, nos ovócitos imaturos, sendo essa observação consistente com outros relatos (Diez et al., 2005; Ferreira et al., 2009). Durante a maturação ocorre a migração dos GC para a periferia do ovócito, pois, as exocitose dos GC previnem a polispermia durante a fecundação. Esse deslocamento dos grânulos corticais foi observado em todos os grupos (MatV, Mats e MatT), mostrando uma maturação adequada (Fair et al., 1995). Outro achado observado na avaliação por MET condizente com a literatura (Hyttel et al., 1997) foi a localização das mitocôndrias. Uma disposição mais periférica foi observada nos ovócitos imaturos e, após a maturação, em todos os grupos, observou-se que elas se deslocaram para uma região mais centralizada do ooplasma, sugerindo que o sistema de maturação TIFOI além de promover um acúmulo de lipídios semelhante aos ovócitos maturados pela superestimulação, também propiciam características citoplasmáticas semelhantes.

Com relação a expressão gênica, foi avaliado o nível de expressão de dois genes relacionados com a síntese de lipídios (ACSS2, ELOVL1) e um de transporte (FABP3). O nível de transcrição de todos os genes diminuiu após a maturação no grupo TIFOI. Portanto, é razoável pensar que os transcritos envolvidos na síntese e transporte de lipídios sejam traduzidos para fornecer aos ovócitos uma possível fonte de energia através da  $\beta$ -oxidação pelas mitocôndrias. Foi demonstrado que ovócitos com maior atividade de  $\beta$ -oxidação têm maior competência para o desenvolvimento (Spindler et al., 2000; Ferguson & Leese et al., 2006; Dunning et al., 2010; Paczkowski et al., 2013; Dunning et al., 2014), inferindo que a  $\beta$ -oxidação é uma importante fonte de energia para os ovócitos durante a maturação. Entretanto, no presente estudo, ovócitos maturados *in vivo* por fêmeas superestimuladas (MatS) apresentaram expressão semelhante, em todos os genes estudados, aos ovócitos maturados pela TIFOI ( $p > 0,05\%$ ). Inesperadamente, eles também foram semelhantes, em relação à expressão gênica, aos ovócitos maturados *in vitro* (MatV) ( $p > 0,05\%$ ). Estes resultados sugerem que a condição hormonal das fêmeas, devido ao tratamento hormonal, pode ter afetado a expressão dos genes dos ovócitos sem afetar o conteúdo das gotículas lipídicas, uma vez que os ovócitos MatV apresentaram maior acúmulo de gotas lipídicas do os outros grupos, mas a expressão gênica foi semelhante. É importante destacar que o gene ACSS2 foi o único que apresentou diferenças na expressão entre MatV e *in vivo* maturado pela TIFOI. Esse gene catalisa a ativação do acetato com a coenzima A para ser usado na síntese lipídica e geração de energia. A razão pela qual apenas IFIOT e não MatS era

diferente de MatV não está clara neste momento, no entanto, não pode ser descartado, como afirmado acima, que o tratamento de superestimulação ovariana também pode alterar o comportamento do ovócito cujo ambiente folicular é modificado com o tratamento de FSH. Considerando que a expressão gênica não era muito diferente entre os grupos, mas que o acúmulo de lipídios era claramente diferente, podemos ter a hipótese de que o sistema *in vitro*, de alguma forma, altera o metabolismo dos lipídios pelas mitocôndrias, reduzindo a capacidade do ovócito de usar essa via energética. Um funcionamento deficiente das mitocôndrias, resultando em menor metabolismo lipídico e, como consequência, um acúmulo exagerado de gotas lipídicas no ooplasma dos ovócitos maturados *in vitro*, tem sido descrito na literatura (Del Collado et al., 2017b). Os ovócitos maturados *in vitro* são mais "estressados" do que aqueles maturados no ambiente folicular e algumas diferenças são encontradas na expressão de genes relacionados ao metabolismo da glicose, lipídios e miRNAs. Essas informações sugerem que o acúmulo de lipídios de ovócitos maturados *in vitro* se deve a uma combinação de menor  $\beta$ -oxidação, estresse oxidativo, que pode induzir estresse no retículo endoplasmático e apoptose (Tsfaye et al. 2009; Del Collado et al., 2017b).

Juntando todos os resultados, podemos assumir que o maior acúmulo de gotas lipídicas nos ovócitos maturados *in vitro* é devido ao ambiente *in vitro*. Além disso, quando os ovócitos são removidos prematuramente do folículo e são maturados dentro do folículo pré-ovulatório pelo TIFOI, eles se comportam de maneira semelhante aos ovócitos maturados *in vivo*. Portanto, foi demonstrado pela primeira vez que a TIFOI pode ser usada como uma alternativa para produzir ovócitos com menos lipídios e qualidade superior quando comparados aos *in vitro*.

## CONCLUSÃO

Pela primeira vez, foi demonstrado que ovócitos maturados pela TIFOI são similares aos ovócitos maturados *in vivo*, quanto ao acúmulo de lipídios, o que implica na superior qualidade quando comparado com os *in vitro*. Este novo método de maturação abre novas possibilidades para as biotecnologias que necessitam da maturação de ovócitos como a PIVE, criopreservação de ovócitos e embriões, clonagem e transgenia.

## REFÊRENCIAS

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

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

AKSU, D.A. et al., Gene expression profiles of vitrified in vitro- and in vivo-derived bovine blastocysts. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 79, p. 613-25. 2012.

ALBUZ, F. K.; SASSEVILLE, M.; LANE, M.; ARMSTRONG, D. T.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. **Human Reproduction**, v.25, p. 2999–3011, 2010.

AMSTISLAVSKY, S.; MOKROUSOVA, V.; BRUSENTSEV, E.; OKOTRUB, K.; COMIZZOLI, P. Influence of Cellular Lipids on Cryopreservation of Mammalian Oocytes and Preimplantation Embryos: A Review. **Biopreservation and Biobanking**, p. 76-83, 2019.

Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne - ABIEC. Perfil da Pecuária no Brasil: **Relatório Anual**, 2018.

BERGFELT, D. R.; BROGLIATTI, G.M.; ADAMS, G.P.; Gamete recovery and follicular transfer (graft) using transvaginal ultrasonography in cattle. **Theriogenology**, v. 50, p. 15-25, 1998.

BERNAL-ULLOA, S.M.; HEINZMANN, J.; HERRMANN, D.; HADELER, K. G.; ALDAG, P.; WINKLER, S. et al. Cyclic AMP Affects Oocyte Maturation and Embryo Development in Prepubertal and Adult Cattle. **PLoS ONE**, v. 11, 2016.

CAIXETA, F. F. M. ; SOUSA, Regivaldo Vieira ; GUIMARÃES, ANA LUIZA ; SPRÍCIGO, JOSÉ FELIPE W. ; LEME, LIGIANE OLIVEIRA ; NETTO, S. B. S. ; PIVATO, Ivo ; Dode, M.N. . Meiotic arrest as an alternative to increase the production of bovine embryos by somatic cell nuclear transfer. **Zygote**, v. 26, p. 1-9, 2016.

DEL COLLADO el al. In vitro maturation impacts cumulus–oocyte complex metabolism and stress in cattle. **Reproduction**, v.154, p.881–893, 2017b.

DEL COLLADO, M. et al. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during *in vitro* maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. **Reproduction, fertility, and development**, v. 28, p. 1721, 2016.

DIEZ, C.; DUQUE, P.; GÓMEZ, H.; HIDALGO, C. O.; TAMARGO, C.; RODRÍGUEZ, A.; FERNÁNDEZ, L.; DE LA VARGA, S.; FERNÁNDEZ, A.; FACAL, N.; CARBAJO, M. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. **Theriogenology**, v. 64, p. 317-333, 2005.

DIÓGENES, M. N.; GUIMARÃES, A. L. S.; LEME, L. O.; MAURÍCIO, M. F.; DODE, M. A. N. Effect of prematuration and maturation with fibroblast growth factor 10 (FGF10) on in vitro development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 102, p. 190-198, 2017.

DUNNING, K.R.; ANASTASI, M.R.; ZHANG, V.J.; RUSSELL, D.L.; ROBKER, R.L. Regulation of fatty acid oxidation in mouse cumulus–oocyte complexes during maturation and modulation by PPAR agonists. **PLoS ONE**, v. 9, p. 87, 2014.

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

EDWARDS, R.G. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. **Lancet**, v. 2, p. 926–929, 1965.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Indicadores de desempenho na pecuária de corte: uma revisão no context da Plataforma + Precoce, 2018.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocytes diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Mol Reprod Dev**, v. 42, n. 4, p. 437-442, 1995.

FERGUSON, E.M.; LEESE, H.J. A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 1195–1201, 2006.

FERREIRA, E.M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, p. 836– 848, 2009.

FLEMING, A. D.; SALGADO, R.; KUEHL, T. J. Maturation of baboon or cow oocytes transplanted into a surrogate. **Theriogenology**, v.23, p.192, 1985.

Food and Agriculture Organization – FAO. Agricultural production, **Livestock Primary**, 2016.

GUIMARÃES, A.L.S.; PEREIRA, S.A.; LEME, L.O.; Dode, M.A.N.. Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 83, p. 52-57, 2015.

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

NAGANO, M. Acquisition of developmental competence and in vitro growth culture of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 65, p. 195–201, 2019.

PACZKOWSKI, M.; SILVA, E.; SCHOOLCRAFT, W.B.; KRISHER, R.L. Comparative importance of fatty acid  $\beta$ -oxidation to nuclear maturation, gene expression, and glucose metabolism in mouse, bovine, and porcine cumulus–oocyte complexes. **Biology of Reproduction**, v. 88, p. 111, 2013.

PAVANI, K. C.; ROCHA, A.; OLIVEIRA, E.; MOREIRA DA SILVA, F.; SOUSA, M. Novel ultrastructural findings in bovine oocytes matured in vitro. **Theriogenology**, v. 143, p. 88-97, 2020.

SPINDLER, R.E.; PUKAZHENTHI, B.S.; WILDT, D.E. Oocyte metabolism predicts the development of cat embryos to blastocyst in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 56, p. 163–171, 2000.

SPRÍCIGO JF, DIÓGENES MN, LEME LO, GUIMARÃES AL, MUTERLLE CV, SILVA BD, SOLÀ-ORIOI D, PIVATO I, SILVA LP, DODE MA. Effects of Different Maturation Systems on Bovine Oocyte Quality, Plasma Membrane Phospholipid Composition and Resistance to Vitrification and Warming. **PLoS One**, 2015.

SPRICIGO, J. F.; SENA NETTO, S. B.; MUTERLLE, C. V.; RODRIGUES, S. D. E. A.; LEME, L. O.; GUIMARAES, A. L.; CAIXETA, F. M.; FRANCO, M. M.; PIVATO, I.; DODE, M. A. Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 86, p. 2054-2062, 2016.

SUDANO, M. J.; CAIXETA, E. S.; PASCHOAL, D. M.; MARTINS, A., JR.; MACHADO, R.; BURATINI, J.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. **Reproduction, fertility, and development**, v. 26, p. 1129-41, 2014.

TESFAYE, D.; GHANEM, N.; CARTER, F.; FAIR, T.; SIRARD, M.A.; HOELKER, M.; SCHELLANDER, K.; LONERGAN, P. Gene expression profile of cumulus cells derived from cumulus-oocyte complexes matured either in vivo or in vitro. **Reproduction Fertility and Development**, v. 21, p. 451–461, 2009.

United States Department of Agriculture - USDA. Livestock, Dairy, and Poultry Outlook. **Economic Research Service**, 2019.

VIANA, J. Statistic of embryos production and transfer in domestic animals. A publication of International Embryo Technology Society (IETS), **Embryo Technology Newsletter**, v. 36, p. 8-19, 2018.