

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL

ASAFE COSTA LOPES

**LIPIDOMA E EXPRESSÃO GÊNICA DE OÓCITOS OBTIDOS DE
DOADORAS DE GENÓTIPOS LEITEIROS *BOS TAURUS*, *BOS
INDICUS* E *BOS TAURUS/INDICUS***

ALFENAS-MG

2022

ASAFE COSTA LOPES

**LIPIDOMA E EXPRESSÃO GÊNICA DE OÓCITOS OBTIDOS DE
DOADORAS DE GENÓTIPOS LEITEIROS *BOS TAURUS*, *BOS
INDICUS* E *BOS TAURUS/INDICUS***

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Biociências Aplicadas à
Saúde, pela Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Biociências aplicadas à saúde.
Orientadora: Professora Dra. Ester Siqueira Caixeta
Nogueira.

ALFENAS-MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Lopes, Asafe Costa.

Lipidoma e expressão gênica de oócitos obtidos de doadoras de genótipos leiteiros *Bos taurus*, *Bos indicus* e *Bos taurus/indicus* / Asafe Costa Lopes. - Alfenas, MG, 2022.

79 f. : il. -

Orientador(a): Ester Siqueira Caixeta Nogueira.

Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Gado de leite. 2. Produção in vitro de embriões. 3. Qualidade oocitária. 4. Perfil lipídico. 5. Perfil transcricional. I. Nogueira, Ester Siqueira Caixeta, orient. II. Título.

ASAFE COSTA LOPES

LIPIDOMA E EXPRESSÃO GÊNICA DE OÓCITOS OBTIDOS DE DOADORAS DE GENÓTIPOS LEITEIROS BOS TAURUS, BOS INDICUS E BOS TAURUS/INDICUS

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biociências Aplicada à Saúde

Aprovada em: 28 de setembro de 2022

Profa. Dra. Ester Siqueira Caixeta Nogueira

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

UNIFAL-MG

Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

UNIFAL-MG

Profa. Dra. Rubia Bueno da Silva

Instituição: Centro Universitário Sudoeste Paulista - Câmpus Avaré

UniFSP

Prof. Dr. Jairo Pereira Neves

Instituição: Universidade José do Rosário Vellano

UNIFENAS

Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes

Instituição: Universidade José do Rosário Vellano

UNIFENAS



Documento assinado eletronicamente por Ester Siqueira Caixeta Nogueira, Professor do Magistério Superior, em 28/09/2022, às 11:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por Carlos Antônio de Carvalho Fernandes, Usuário Externo,



em 28/09/2022, às 11:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rubia Bueno da Silva, Usuário Externo**, em 28/09/2022, às 11:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Valdemar Antônio Paffaro Júnior, Professor do Magistério Superior**, em 29/09/2022, às 20:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **JAIRO PEREIRA NEVES, Usuário Externo**, em 13/10/2022, às 18:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0820943** e o código CRC **1EB762E1**.

Dedico a Deus, aos meus pais e irmão, a minha namorada por todo apoio e compreensão, e de forma especial à Senhora Léa Caixeta LOPES, por ter antevisto a realização deste feito antes de qualquer outra pessoa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me capacitou e permitiu que eu trilhasse todo o caminho ao longo da graduação e mestrado para que esse momento pudesse se realizar. A minha orientadora, Profa. Dra. Ester Siqueira Caixeta Nogueira que não mediu esforços para me auxiliar nessa empreitada, por ter me concedido não somente ensinamentos acadêmicos, mas também princípios de vida. Ao professor Carlos Antônio de Carvalho Fernandes, pela cessão dos animais destinados a realização desta pesquisa por meio de sua instituição: Biotran Assessoria e Consultoria em Medicina Veterinária LTDA, a Universidade de Purdue pela parceria na realização das análises de espectrometria de massas. Agradeço também de forma muito especial minha família, que jamais negou auxílio nos momentos necessários, que compreendeu o quanto a caminhada é longa, que motivou, que foi minha força quando as minhas se esgotaram, que foram esperança na desesperança. Importante também lembrar de minha avó, Léa, que segundo relatos, quando nasci dizia que eu um dia seria doutor, fato que hoje se realiza. Dedico também este trabalho à minha namorada, por toda paciência, investimento, compreensão, que foram essenciais para que eu pudesse ter tempo e vigor para que tudo pudesse ser realizado dentro dos prazos corretos, que me motivou e incentivou, bem como mostrou a importância desta etapa em minha vida. Agradeço ainda a FAPEMIG e ao CNPq (processo nº 420581/2016-2) pelo fornecimento dos subsídios para a compra de materiais sem os quais não seriam possíveis a execução do trabalho, as fazendas e outras instituições parceiras que disponibilizaram animais para a realização do trabalho. Importante ainda lembrar dos coordenadores do programa de Doutorado, sempre solícitos e ávidos em fazer com que tivesse um doutoramento de alta qualidade, fazendo do programa de Biociências Aplicadas à Saúde um curso de alta relevância. Agradeço aos meus professores que sempre se esforçaram para que pudesse aprender da melhor maneira os conteúdos passados, à banca avaliadora, sem o qual não haveriam as sugestões necessárias para a melhoria do presente trabalho, e por fim, a todos os colaboradores da Universidade Federal de Alfenas, que mesmo muitas vezes imperceptíveis estavam lá auxiliando e promovendo toda a estrutura necessária para que o curso de Doutorado pudesse existir, para que os laboratórios pudessem funcionar e para que os documentos estivessem organizados e prontos. A todos citados acima, quero que saibam que foram essenciais nessa jornada, cada um no seu papel. Vocês jamais serão esquecidos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Remember that you are a Black Swan.”
- Nassim Nicholas Taleb,

RESUMO

Nos últimos anos observou-se um aumento expressivo do uso da produção *in vitro* de embriões (PIVE) em raças leiteiras. É conhecido que diferenças no potencial de desenvolvimento oocitário entre fêmeas de raças taurinas (*Bos taurus*) e zebuínas (*Bos indicus*) afetam consideravelmente a eficiência e a viabilidade econômica da PIVE e que o metabolismo lipídico pode estar relacionado a variações individuais no potencial de desenvolvimento oocitário, o presente estudo teve por objetivo avaliar o conteúdo e o perfil lipídico, além da expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico em oócitos de doadoras das raças Gir (*Bos indicus*), Holandesa (*Bos taurus*) e mestiças 1/2 Holandês x 1/2 Gir (*Bos taurus/indicus*). Os complexos cumulus-oócitos (COCs) foram recuperados por aspiração folicular e processados para separar os oócitos das células do cumulus. Os oócitos foram então direcionados para as seguintes análises: avaliação semi-quantitativa das gotas lipídicas citoplasmáticas através da coloração por Sudan Black B, análise do perfil lipídico através da espectrometria de massas utilizando o monitoramento de reações múltiplas (MRM) e análise da abundância do RNAm de genes envolvidos no metabolismo lipídico através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. A concentração de triacilgliceróis, éster de colesterol, diacilglicerol, fosfatidilinositol e ceramida não variou entre as diferentes raças. Entretanto, a abundância total de fosfatidilcolina foi maior nos oócitos das doadoras Gir comparado com as Holandesas e mestiças, e a abundância de esfingomielina e fosfatidiletanolamina foi maior nos oócitos Gir comparado com as Holandesas, enquanto as mestiças não diferiram das demais raças. A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) mostrou que houve estratificação entre as raças considerando os lipídios de membrana, indicando que a raça teve efeito no perfil dos lipídios de membrana nos oócitos e, a ANOVA determinou que 19 espécies lipídicas foram diferentes entre as raças. O nível de RNAm da *SPHK2*, *ACSL3* e *CPT2* foi maior nos oócitos imaturos das doadoras Gir e mestiças, enquanto a abundância do RNAm da *LRAT* foi maior nos oócitos imaturos dos animais Gir em relação as Holandesas, tendo os oócitos dos animais mestiços uma abundância intermediária de *LRAT*. A expressão de *ATX*, *CPT1B*, *ACADL* e *CD36* foi maior nos oócitos imaturos de Gir comparado com as Holandesas. Em relação aos oócitos maturados *in vitro*, a abundância de *ATX*, *CPT1B* e *CD36* foi maior nos oócitos das vacas Gir e mestiças comparada com as Holandesas, enquanto a abundância do RNAm da *LRAT* e *ACADL* foi maior nos oócitos dos animais Gir em relação as Holandesas, tendo os oócitos dos animais mestiços uma abundância intermediária. Além disso, a expressão de *SPHK1* e *CPT1A* também foi maior nos animais Gir em relação aos Holandeses. O perfil lipídico e transcricional pôde ser mais claramente discriminado entre os oócitos das raças puras, Gir e Holandesa. A maior concentração de lipídios de membrana nos oócitos Gir, associada à maior abundância de genes que metabolizam esses lipídios, indicam haver condições metabólicas que favoreçam a geração de mensageiros químicos importantes para o desenvolvimento do oócito nos animais Gir em relação aos Holandeses.

Palavras-chave: Gado de leite, Produção *in vitro* de embriões, Qualidade oocitária, Perfil lipídico, Perfil transcricional.

ABSTRACT

The use of in vitro embryo production (IVP) for dairy breeds has increased significantly in recent years. Differences in the number and developmental potential of oocytes between female taurine (*Bos taurus*) and zebu (*Bos indicus*) breeds affect the efficiency and economic viability of IVP. The aim of this study was evaluate the lipid profile and content, as well as the mRNA abundance of genes involved in lipid metabolism, in oocytes recovered from the following dairy breeds: Gir (*Bos indicus*), Holstein (*Bos taurus*), and their crossbreeds (1/2 Holstein × 1/2 Gir). Cumulus-oocyte complexes (COCs) were recovered by follicular aspiration, and immature COCs were processed to separate oocytes from cumulus cells, and then subjected to semi-quantitative evaluation of oocyte cytoplasmic lipid droplets using Sudan Black B staining, analysis of the lipid profile through mass spectrometry using multiple reaction monitoring, and abundance analysis of the mRNA of genes involved in lipid metabolism through real-time polymerase chain reaction. To analyze gene expression in oocytes matured in vitro, immature COCs were subjected to in vitro maturation for 24 h. Cytoplasmic lipid content was found to be similar in immature oocytes obtained from Gir, Holstein, and crossbred donors. The concentrations of triacylglycerols, cholesteryl ester, diacylglycerol, phosphatidylinositol, and ceramide did not vary between breeds. The total abundance of phosphatidylcholine was higher in oocytes from Gir donors than in those from Holsteins and crossbreeds, and the abundance of sphingomyelin and phosphatidylethanolamine was higher in Gir oocytes than in Holstein oocytes, whereas that of crossbreeds did not differ from that of the other breeds. Partial least squares discriminant analysis showed stratification between breeds in terms of membrane lipids, indicating that breed had an effect on the profile of membrane lipids in oocytes, and 19 lipid species were determined to be different between breeds using analysis of variance. The mRNA levels of *SPHK2*, *ACSL3A*, and *CPT2* were higher in immature oocytes from Gir and crossbred donors, whereas the abundance of *LRAT* mRNA was higher in immature oocytes from Gir donors than in Holstein oocytes, with oocytes from crossbred donors having an intermediate *LRAT* mRNA abundance. The expression levels of *ATX*, *CPT1B*, *ACADL*, and *CD36* were higher in immature Gir oocytes than in Holstein oocytes. In relation to in vitro-matured oocytes, the abundance of *ATX*, *CPT1B*, and *CD36* was higher in oocytes from Gir and crossbred cows than in those from Holstein cows, whereas the abundance of *LRAT* and *ACADL* mRNA was higher in oocytes from Gir cows than in those from Holstein cows, with oocytes from crossbred cows having an intermediate abundance. Furthermore, the expression of *SPHK1* and *CPT1A* was higher in Gir cows than in Holstein cows. Lipid and transcriptional profiles showed clear differences between purebred, Gir, and Holstein oocytes. The higher concentration of membrane lipids in Gir oocytes, associated with the greater abundance of genes that metabolize these lipids, indicated that there are metabolic conditions that particularly favor the generation of important chemical messengers for oocyte development in Gir cows, as compared to that in Holstein cows.

Keywords: Dairy cattle, *In-vitro* embryo production, Oocyte quality, Lipid profile, Transcriptional profile.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação pela PCR em tempo real.....40
- Tabela 2 - Concentração relativa de cada classe lipídica monitorada nos oócitos imaturos obtidos de doadoras Gir (GIR), 1/2 Holandês x 1/2 Gir (HOLxGIR) e Holandesa (HOL).43
- Tabela 3 - Proporção dos 15 lipídios de membrana mais abundantes, um em relação ao outro, nos oócitos imaturos obtidos de doadoras Gir (GIR), 1/2 Holandês x 1/2 Gir (HOLxGIR) e Holandesa (HOL).44
- Tabela 4 - Espécies lipídicas diferencialmente expressas entre oócitos imaturos obtidos de doadoras Gir (GIR), 1/2 Holandês x 1/2 Gir (HOLxGIR) e Holandesa (HOL).47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura das principais classes de lipídios de membrana.23
- Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo de atividade enzimática da lecitina retinol aciltransferase (LRAT). PC, fosfatidilcolina; Lyso-PC, lisofosfatidilcolina.24
- Figura 3 - Produção do ácido lisofosfatídico (LPA) a partir de fosfolipídios (PLs) de membrana. PLA1, fosfolipase A1; PLA2, fosfolipase A2; ATX, autotaxina.25
- Figura 4 - Representação esquemática do metabolismo da esfingomielina (SM). SMase, esfingomielinase; S1P, esfingosina-1-fosfato.....26
- Figura 5 - Ativação de ácidos graxos de cadeia longa, entrada na mitocôndria e metabolismo via oxidação de ácidos graxos.29
- Figura 6 - Representação esquemática da função de enzimas importantes no metabolismo de ácidos graxos.30
- Figura 7 - Análise semiquantitativa do conteúdo lipídico citoplasmático de oócitos imaturos obtidos de doadoras Gir (GIR), 1/2 Holandês x 1/2 Gir (HOLxGIR) e Holandesa (HOL) expressa em intensidade de cinza por área (média ± S.E.M.).42
- Figura 8 - Gráficos bidimensional (A) e tridimensional (B) da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para os perfis lipídicos incluindo, fosfatidilcolina (PC), esfingomielina (SM), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) e ceramida dos oócitos imaturos das raças Gir (GIR), 1/2 Holandês x 1/2 Gir (HOLxGIR) e Holandesa (HOL; pools de cinco oócitos por réplica; n=6 – 9 por raça).....45
- Figura 9 - Espécies lipídicas que apresentaram scores de importância variável (VIP) > 1 identificadas pela análise de PLS-DA nos oócitos imaturos de doadoras das raças Gir (GIR), 1/2 Holandês x 1/2 Gir (HOLxGIR) e Holandesa (HOL).46
- Figura 10 - Gráfico bidimensional da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para os perfis lipídicos incluindo, triacilglicerol (TAG), diacilglicerol e éster de colesterol de oócitos imaturos.48

Figura 11 - Abundância de RNAm da LRAT, ATX, PLA2, LPAR2 e SPHK1 em oócitos imaturos de doadoras Gir (GIR), 1/2 Holandês x 1/2 Gir (HOLxGIR) e Holandesa (HOL).	49
Figura 12 - Abundância de RNAm da ACSL3, ACSL6, CPT1A, CPT1B, CPT2, ACADL, ACAA2, ACACA, FABP5, CD36 e PLIN2 em oócitos imaturos de doadoras Gir (GIR), 1/2 Holandês x 1/2 Gir (HOLxGIR) e Holandesa (HOL).....	50
Figura 13 - Abundância de RNAm da LRAT, ATX, PLA2, LPAR2 e SPHK1 em oócitos maturados in vitro de doadoras Gir (GIR), 1/2 Holandês x 1/2 Gir (HOLxGIR) e Holandesa (HOL).	51
Figura 14 - Abundância de RNAm da ACSL3, ACSL6, CPT1A, CPT1B, CPT2, ACADL, ACAA2, ACACA, FABP5, CD36 e PLIN2 em oócitos maturados in vitro de doadoras Gir (GIR), 1/2 Holandês x 1/2 Gir (HOLxGIR) e Holandesa (HOL).	52
Figura 15 - Representação esquemática dos principais resultados e conclusões fornecidas pelo presente trabalho.....	61

LISTA DE ABREVIACÕES

ACAA2	Acetil-CoA aciltransferase 2
ACACA	Acetil coenzima-A carboxilase
ACADL	Acil-CoA desidrogenase de cadeia longa
ACSL	Acil-CoA sintetases de cadeia longa
ACSL3	Acil-CoA sintetases de cadeia longa 3
ACSL6	Acil-CoA sintetases de cadeia longa 6
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina Trifosfato
ATX	Autotaxina
CD36	Receptor de trombospondina
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CoA	Coenzima-A
COC	Complexo Cumulus-Oócito
CPT1	Carnitina Palmitoil Transferase 1
CPT1A	Carnitina Palmitoil Transferase 1A
CPT1B	Carnitina Palmitoil Transferase 1B
CPT2	Carnitina Palmitoil Transferase 2
F1	Filhos(as) de primeira geração
FABP	Proteína de ligação aos Ácidos Graxos
FABP5	Proteína de ligação aos Ácidos Graxos 5
FAT	Ácido Graxo Translocase
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GIR	Gir
H2AFZ	Histona H2AFZ
HOL	Holandesa
HOLxGIR	1/2 Holandês × 1/2 Gir
LABAint	Laboratório de Biologia Animal Integrativa
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPAR2	Receptor do ácido lisofosfatídico 2
LRAT	Lecitina retinol aciltransferase

MRM-profiling	Perfil do monitoramento de reações múltiplas
OPU	Aspiração folicular de oócitos
PBS	Tampão fosfato-salino
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PE	FosfatidiletanolAMIna
PG	Fosfatidilglicerol
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PLA1	Fosfolipase A1
PLA2	Fosfolipase A2
PLIN2	Perilipina 2
PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais
PPIA	Peptidilprolil isomerase A
PS	Fosfatidilserina
Q1	Primeiro quadrupolo
Q3	Terceiro quadrupolo
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
RNA _m	Ácido Ribonucleico Mensageiro
S1P	Esfingosina-1-fosfato
SM	Esfingomielina
SPHK1	Esfingosina kinase 1
TAG	Triacilglicerol
TCM 199	Meio de cultivo de tecidos 199
UNIFAL	Universidade Federal de Alfenas
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

LISTA DE SÍMBOLOS

μl	Microlitro
CO_2	Dióxido de Carbono
Hg	Mercúrio
m/z	Razão massa sobre a carga
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	A IMPORTÂNCIA DA PIVE EM RAÇAS LEITEIRAS	20
2.2	METABOLISMO DOS LIPÍDIOS DE MEMBRANA E A COMPETÊNCIA OOCITÁRIA	22
2.3	LIPÍDIOS DE RESERVA ENERGÉTICA E A COMPETÊNCIA OOCITÁRIA	27
3	OBJETIVOS	32
3.1	GERAL	32
3.2	ESPECÍFICOS	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	LOCAL E POPULAÇÃO EXPERIMENTAL	33
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
4.2.1	Análise semiquantitativa das gotas lipídicas citoplasmáticas	33
4.2.2	Análise do perfil lipídico por espectrometria de massas	34
4.2.3	Análise de transcritos relacionados ao metabolismo lipídico	34
4.3	ASPIRAÇÃO FOLICULAR E RECUPERAÇÃO DOS COCS	34
4.4	MATURAÇÃO IN VITRO	35
4.5	ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DAS GOTÍCULAS LIPÍDICAS CITOPLASMÁTICAS NOS OÓCITOS	35
4.6	CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO NOS OÓCITOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	36
4.6.1	Extração de lipídios	36
4.6.2	Espectrometria de massas utilizando o perfil de monitoramento de reações múltiplas	37
4.7	PERFIL DE TRANSCRITOS RELACIONADOS AO METABOLISMO LIPÍDICO NOS OÓCITOS	38

4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5	RESULTADOS	42
5.1	CONTEÚDO DE GOTÍCULAS LIPÍDICAS CITOPLASMÁTICAS DO OÓCITO	42
5.2	PERFIL LIPÍDICO NOS OÓCITOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	42
5.3	PERFIL DE TRANSCRITOS RELACIONADOS AO METABOLISMO LIPÍDICO NOS COCS.....	48
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS	62
	APÊNDICE	71

1 INTRODUÇÃO

A pecuária leiteira é de fundamental importância para o setor agropecuário brasileiro, com produção em 98% dos municípios brasileiros, empregando perto de 4 milhões de pessoas (EMBRAPA, 2022). De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA), o Brasil ocupou a sexta posição no ranking mundial de produção de leite em 2020. A importância que a atividade leiteira adquiriu no país é inquestionável, tanto no desempenho econômico como na geração de empregos permanentes.

Embora parte do rebanho leiteiro brasileiro seja constituído de animais de raças taurinas, principalmente Holandesa e Jersey, uma grande proporção dos animais destinados à produção leiteira é de origem zebuína ou seus cruzamentos. Animais que nas condições de clima e manejo das propriedades brasileiras, podem ser tão ou mais produtivos que as raças taurinas. Dentro deste universo, ocupam posição de destaque os mestiços Holandês x Gir, os quais devido aos efeitos favoráveis de heterose e complementariedade das raças possuem aptidão leiteira e maior adaptabilidade (MADALENA *et al.*, 2012).

No entanto, um dos principais desafios para a maioria dos produtores de leite com gado mestiço é a dificuldade em manter os rebanhos no grau de sangue desejado, quer seja pela inseminação artificial ou pela monta natural (GOULART *et al.*, 2009). Neste sentido, o uso de biotécnicas como a produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma alternativa para a formação e manutenção de rebanhos que visam a utilização de fêmeas mestiças para a produção de leite. De fato, nos últimos anos observou-se um aumento expressivo do uso da PIVE em raças leiteiras, incluindo Holandesas, Gir e mestiças 1/2 Holandês x 1/2 Gir (VIANA *et al.*, 2012, 2017, 2018), o que pode ser atribuído, em grande parte, pela disponibilidade de sêmen sexado (RATH; JOHNSON, 2009; PONTES *et al.*, 2010; VIANA *et al.*, 2018) e pela demanda de animais de produção, como no caso dos rebanhos mestiços. Realmente, há um esforço contínuo para o uso da PIVE em grande escala destinada à produção de bezerras mestiças Holandês x Gir (VIANA *et al.*, 2012; SARTORI *et al.*, 2016).

Sabe-se que diferenças no número de folículos ovarianos disponíveis para a aspiração e na competência oocitária de fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus* têm um efeito significativo na eficiência e viabilidade econômica da PIVE. De fato, nas doadoras Gir (*Bos indicus*) um maior número de oócitos são recuperados por aspiração e há uma maior taxa de oócitos viáveis e produção de blastocistos, influenciando diretamente no número de prenhez por aspiração, quando comparados com doadoras Holandesas (*Bos taurus*; CAMARGO *et al.*, 2007; PONTES

et al., 2010; SALES *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2019). Sendo assim, novos estudos que busquem elucidar os mecanismos moleculares que estão envolvidos no melhor desempenho reprodutivo de determinadas raças doadoras são de grande importância para a melhoria da eficiência do processo de PIVE nestes animais.

Neste contexto, é conhecido que a capacidade do oócito para sofrer a maturação completa, a fecundação e formar um embrião viável é influenciada pelo conteúdo e metabolismo dos lipídios (McEVOY *et al.*, 2000; AARDEMA *et al.*, 2011; DUNNING *et al.*, 2014a). Na última década uma atenção especial tem sido dada ao estudo do metabolismo lipídico nos complexos cumulus-oócitos (COCs), sendo sugerido que os lipídios podem representar importantes biomarcadores para o desenvolvimento oocitário (MONTANI *et al.*, 2012; DEL COLLADO *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2020). Os lipídios desempenham papéis importantes como armazenamento de energia, componente estrutural das membranas biológicas e precursores de moléculas de sinalização que ajudam a coordenar eventos fundamentais durante o desenvolvimento dos gametas (KIM *et al.*, 2001; CETICA *et al.*, 2002; AMI *et al.*, 2011). Nas células de mamíferos, os triacilgliceróis (TAGs) e ésteres de colesterol são armazenados como gotículas de lipídios no citoplasma e, funcionam como principal fonte de energia (McKEEGAN; STURMEY, 2011), enquanto os fosfolipídios, como as fosfatidilcolinas (PC) e esfingomielinas (SM), são as principais moléculas nas membranas celulares, regulando sua fluidez e permeabilidade, além de participarem em inúmeras vias de sinalização celular (HANNUN *et al.*, 2001; KAHN *et al.*, 2021).

O conteúdo de lipídios nos oócitos bovinos tende a aumentar progressivamente com o crescimento do gameta, enquanto, durante a maturação o conteúdo de TAGs diminui e a atividade mitocondrial aumenta, sugerindo que o estoque de gotículas lipídicas citoplasmáticas é utilizado como uma fonte de energia celular, proporcionando ATP para a síntese de proteínas e outras moléculas, as quais são necessárias para a continuação da maturação e posterior fecundação (KIM *et al.*, 2001; CETICA *et al.*, 2002; TARAZONA *et al.*, 2006; FAIR *et al.*, 2007). Além disso, os fosfolipídios e o colesterol são essenciais para a formação das membranas celulares e, portanto, um requisito fundamental durante as rápidas divisões celulares após a fecundação (McEVOY *et al.*, 2000, GONZÁLEZ-SERRANO *et al.*, 2013). Portanto, mudanças na composição lipídica do oócito podem ter um impacto significativo em funções biológicas que influenciam na competência oocitária (KIM *et al.*, 2001; CASTANEDA *et al.*, 2013).

Sabendo-se das diferenças entre as raças zebuínas e europeias quanto ao desempenho reprodutivo e que a composição e o metabolismo lipídico podem estar relacionados a variações no potencial de desenvolvimento dos oócitos, os objetivos do presente estudo foram avaliar o

conteúdo das gotículas lipídicas citoplasmáticas, o perfil lipídico por espectrometria de massas, e a expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico em oócitos obtidos de vacas das raças Gir (*Bos indicus*), Holandesa (*Bos taurus*) e mestiça 1/2 Holandês x 1/2 Gir (1/2 *Bos indicus* x 1/2 *Bos taurus*).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A IMPORTÂNCIA DA PIVE EM RAÇAS LEITEIRAS

A PIVE bovina é uma biotecnologia utilizada em todo o mundo, sendo o Brasil um país pioneiro na sua utilização em larga escala, tornando-se uma referência mundial na técnica (VIANA *et al.*, 2018). O aumento no número de laboratórios que oferecem essa biotécnica, a torna cada vez mais acessível aos pecuaristas. Seu princípio se baseia na aspiração folicular guiada por ultrassonografia, seguida pela maturação *in vitro* e fecundação *in vitro* dos oócitos obtidos e posterior cultivo *in vitro* dos zigotos produzidos. Na sequência, os embriões são transferidos para as vacas receptoras após seis ou sete dias de cultivo. Dentre as vantagens reprodutivas da PIVE, destacam-se a redução no intervalo entre gerações, obtida pela utilização de animais bastante jovens, e o acelerado progresso genético, conseguido pela intensa exploração de matrizes geneticamente superiores (GONÇALVES *et al.*, 2002).

No Brasil, a popularização da PIVE bovina entre criadores e selecionadores genéticos esteve associada inicialmente às raças zebuínas de corte, com destaque para a raça Nelore. Dentre os fatores que impulsionaram esta particularidade estão a composição de nossos rebanhos majoritariamente formada por animais zebuínos ou seus cruzamentos e a eficiência da técnica a qual é maior em raças zebuínas, devido ao maior número de oócitos obtidos por sessão de aspiração somado às melhores taxas de embriões produzidos *in vitro* (DE ROOVER *et al.*, 2008; WATANABE *et al.*, 2008). Contudo, nas últimas décadas observou-se um crescimento progressivo do emprego da PIVE em raças leiteiras (VIANA *et al.*, 2012; 2017; 2018). No período de 2005 a 2010 o uso da PIVE no gado leiteiro aumentou 764% (VIANA *et al.*, 2012). Como consequência, o mercado nacional, caracterizado em 2007 pela predominância de raças zebuínas e de corte, registrou em 2017 maior produção de embriões *in vitro* em raças leiteiras (GONÇALVES; VIANA, 2019). Atualmente, tanto nos EUA quanto no Brasil, a maioria dos embriões PIV vem de raças leiteiras (58,8% e 53,6%; respectivamente; VIANA, 2020). Um dos fatores que contribuíram para este crescimento foi a disponibilidade de sêmen sexado a partir do ano de 2005 (RATH; JOHNSON, 2009; PONTES *et al.*, 2010; VIANA *et al.*, 2018), uma vez que o maior percentual de machos nascidos com o uso de sêmen convencional era um dos fatores que inviabilizava o uso da técnica em animais leiteiros (SIQUEIRA *et al.*, 2012).

O aumento da PIVE em raças leiteiras inclui principalmente as raças Holandesa (*Bos taurus*) e Gir (*Bos indicus*), justificado sobretudo pela grande demanda de animais de reposição em rebanhos mestiços Holandês x Gir. Adicionalmente, os animais resultantes dos cruzamentos de primeira geração (1/2 Holandês x 1/2 Gir) têm sido amplamente utilizado como doadores de oócitos para produzir outros cruzamentos, como 3/4 e 1/4 (VIANA *et al.*, 2012; SARTORI *et al.*, 2016).

Tem sido relatado que particularidades reprodutivas entre fêmeas de raças europeias (*Bos taurus*) e zebuínas (*Bos indicus*) afetam consideravelmente a eficiência e a viabilidade econômica da PIVE (SIQUEIRA *et al.*, 2012). Dentre elas, destacam-se o número de folículos disponíveis para aspiração nos ovários e a qualidade e o potencial de desenvolvimento dos oócitos recuperados (LOPES *et al.*, 2006; CAMARGO *et al.*, 2007; DE ROOVER *et al.*, 2008). De fato, Pontes e colaboradores (2010) mostraram que o número de oócitos e de embriões produzidos por aspiração foram superiores nas doadoras Gir quando comparado com as doadoras Holandesas. Em adição, Camargo *et al.*, (2007) comparando as mesmas raças doadoras, encontraram uma maior taxa de clivagem e produção de blastocistos, baseado no número de oócitos recuperados, em doadoras Gir. Mais recentemente, Oliveira *et al.*, (2019) relataram que a produção de embriões F1 obtidos de animais Gir e Holandês, em condições tropicais, foi mais eficiente quando os oócitos foram obtidos de doadoras Gir em comparação com doadoras Holandesas, devido a um maior número de oócitos recuperados, maior porcentagem de oócitos viáveis, aumento na taxa de gestação tardia e menor perda gestacional nas doadoras Gir. Estes resultados indicam que a origem do oócito afeta a capacidade de sobrevivência dos embriões e fetos durante o desenvolvimento pós-implantação (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Portanto, a literatura mostra que doadoras da raça Gir apresentam um número superior de COCs recuperados após aspiração folicular e melhor qualidade intrínseca dos oócitos em relação às Holandesas. Entretanto, características moleculares específicas dos oócitos recuperados desses grupos genéticos ainda necessitam ser mais estudadas.

Dentre os fatores que justificam o menor desempenho reprodutivo de animais das raças *Bos taurus*, destaca-se a maior susceptibilidade destes animais ao estresse térmico. Em fêmeas europeias, a exposição a temperaturas tropicais e subtropicais comprovadamente prejudica o crescimento folicular, a secreção hormonal (WOLFENSON *et al.*, 1995), reduz o potencial de desenvolvimento do oócito e a taxa de fecundação, além de comprometer o desenvolvimento embrionário (AL-KATANANI *et al.*, 2002; SARTORI *et al.*, 2002; SATRAPA *et al.*, 2011). Em contraste, animais zebuínos são mais adaptados ao clima tropical, demonstrando maior tolerância ao calor. Portanto, animais *Bos indicus* têm mostrado melhor desempenho

reprodutivo se comparados a animais *Bos taurus* quando em regiões tropicais e subtropicais (BO *et al.*, 2003; CAMARGO *et al.*, 2007). Durante o desenvolvimento folicular e oocitário, o oócito acumula componentes citoplasmáticos incluindo proteínas, fatores de transcrição, RNAs e lipídios que irão regular a maturação final do COC e o desenvolvimento embrionário inicial. O estresse calórico pode ativar processos biológicos intracelulares que modificam esses componentes de maneira distinta nos oócitos de animais *Bos taurus* e *Bos indicus* (PAULA-LOPES *et al.*, 2013). Neste sentido, tem sido mostrado que a regulação do conteúdo de lipídios no oócito é de grande importância na aquisição da competência oocitária e nas etapas iniciais do desenvolvimento embrionário (AARDEMA *et al.*, 2011; VAN HOECK *et al.*, 2011).

2.2 METABOLISMO DOS LIPÍDIOS DE MEMBRANA E A COMPETÊNCIA OOCITÁRIA

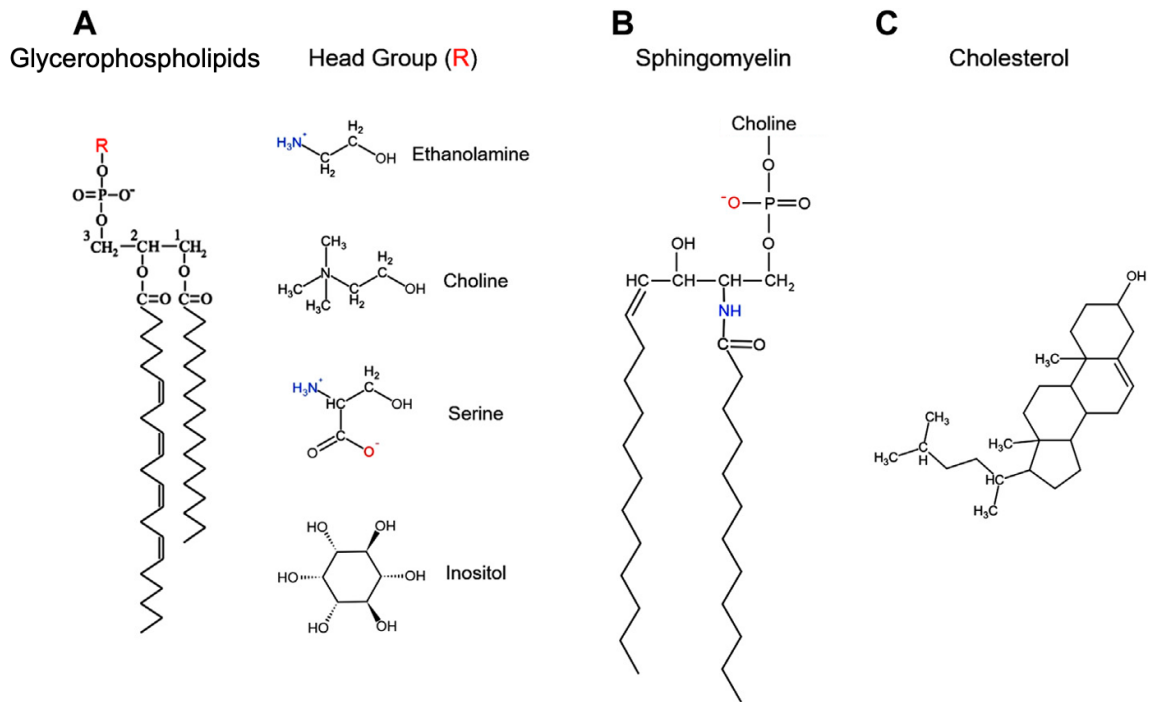
A competência oocitária é progressivamente adquirida durante os estágios da foliculogênese através de várias alterações celulares e moleculares, incluindo o armazenamento de RNAs maternos, proteínas e metabólitos que proporcionam ao oócito a capacidade de passar pela maturação, fecundação e se desenvolver até o estágio de blastocisto (DONNISON; PFEFFER, 2004; SIRARD *et al.*, 2006; FARIN *et al.*, 2007).

Como já mencionado, o conteúdo e o metabolismo lipídico influenciam diretamente a qualidade do oócito e, portanto, sua competência para sofrer a maturação completa e o desenvolvimento embrionário. Mudanças na composição lipídica do oócito podem ter um impacto significativo em funções biológicas cruciais. Portanto, estudar o papel do metabolismo lipídico nos COCs pode ampliar o conhecimento sobre a qualidade e a competência oocitária (KIM *et al.*, 2001; CASTANEDA *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2020).

As membranas celulares são compostas por três grandes categorias de lipídios, os glicerofosfolipídios, esfingolipídios e colesterol (Figura 1). Os glicerofosfolipídios são fosfolipídios que contêm glicerol na sua estrutura e, podem ser divididos em quatro classes com base no seu grupo de cabeça hidrofílica: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) e fosfatidilinositol (PI; Figura 1A). O principal esfingolipídeo encontrado na membrana plasmática é a esfingomielina (SM), que contém uma base esfingoide de cadeia longa (a esfingosina), um ácido graxo de cadeia longa e um grupo polar do tipo fosforilcolina, sendo também classificada como um fosfolipídio (Figura 1B; VAN MEER *et al.*, 2008). O colesterol é composto por uma estrutura esteróide de quatro anéis não polares que permitem que ele se encaixe profundamente na bicamada lipídica, além de uma cadeia lateral de

hidrocarbonetos e um grupo hidroxila hidrofílico (Figura 1C; DUFOURC, 2008). É conhecido que a composição dos lipídios de membrana determina as propriedades físico-químicas das membranas celulares, incluindo fluidez e permeabilidade (EDIDIN, 2003; VAN MEER *et al.*, 2008).

Figura 1 - Estrutura das principais classes de lipídios de membrana.



Fonte: MOSTAFA *et al.*, 2022.

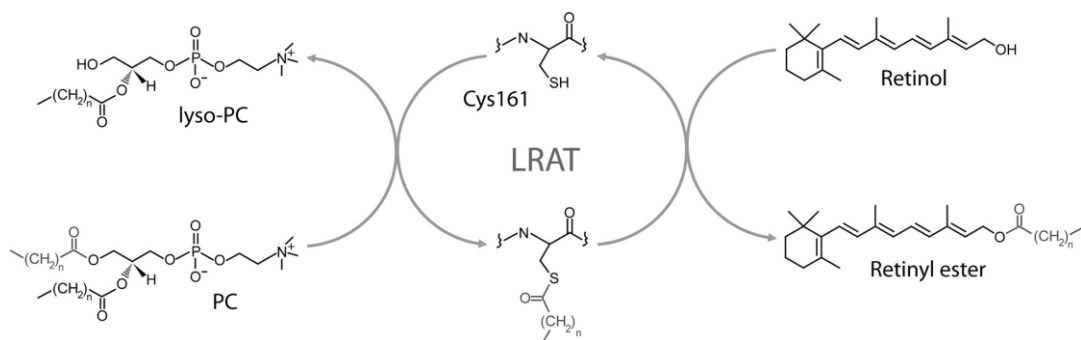
Visto que os fosfolipídios e o colesterol desempenham um importante papel estrutural, eles são essenciais para a formação das novas membranas durante as rápidas divisões celulares após a fecundação (McEVOY *et al.*, 2000; McKEEGAN; STURMEY, 2011). Outra importante função dos lipídios de membrana é permitir a ligação de proteínas de sinalização à membrana celular. Além disso, os fosfolipídios servem como precursores para a formação de segundos mensageiros lipídicos que medeiam inúmeras respostas celulares capazes de influenciar o desenvolvimento do oócito (McEVOY *et al.*, 2000; DUNNING *et al.*, 2014a; MOSTAFA *et al.*, 2022).

Um recente estudo demonstrou que oócitos imaturos de melhor qualidade morfológica possuem maior abundância de PC e PI quando comparado com oócitos de pior qualidade (CHEN *et al.*, 2020). Os autores relacionaram a menor abundância de PI em oócitos de pior qualidade com uma deficiência na via de sinalização da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). A

PI3K é a enzima responsável por fosforilar o carbono 3 do anel do inositol gerando o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), que serve como sítio de ancoragem para várias proteínas de sinalização intracelular, sendo uma via com função central na promoção do crescimento e sobrevivência celular. De fato, em oócitos de camundongos a via PI3K está envolvida na regulação do crescimento oocitário e no desenvolvimento inicial dos folículos ovarianos (LIU *et al.*, 2006).

Adicionalmente, Chen e colaboradores (2020) discutiram a importância da maior abundância de PC em oócitos de melhor qualidade, considerando que a PC pode ser um substrato para a enzima lecitina retinol aciltransferase (LRAT) que catalisa a transferência do grupo acil da PC para o retinol, produzindo o éster de retinol (Figura 2). Uma deficiência nessa via compromete a retenção e armazenamento de vitamina A e a geração do ácido retinóico, compostos que impactam positivamente a maturação do oócito, fecundação e desenvolvimento embrionário (NASIRI *et al.*, 2011; BEST *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2020).

Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo de atividade enzimática da lecitina retinol aciltransferase (LRAT). PC, fosfatidilcolina; Lyso-PC, lisofosfatidilcolina.



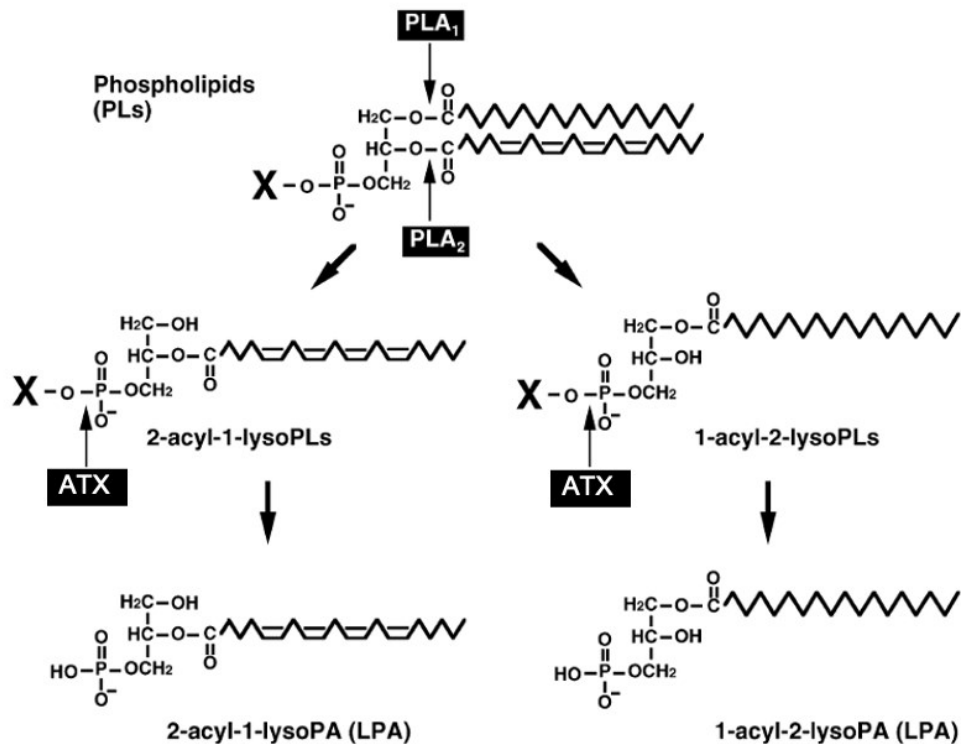
Fonte: GOLCZAK; PALCZEWSKI, 2010.

Além das PCs serem um substrato para a síntese de ésteres de retinol, juntamente com outros fosfolípidios, elas são também uma importante fonte para a formação do ácido lisofosfatídico (LPA). O LPA é uma molécula sinalizadora que participa de processos biológicos como proliferação celular, prevenção de apoptose, diferenciação e morfogênese (AOKI *et al.*, 2004). A maioria dessas ações do LPA é mediada por pelo menos 6 tipos de receptores acoplados à proteína G (LPAR1 a LPAR6), sendo que os LPAR1 a LPAR4 já foram detectados em oócitos bovinos (BORUSZEWSKA *et al.*, 2014).

O LPA consiste em 3 domínios estruturais, sendo: um esqueleto de glicerol, uma única cadeia de acil graxo que está ligada ao carbono 1 ou 2 do glicerol e um grupo fosfato ligado ao carbono 3 do glicerol. Uma das principais vias para a formação do LPA envolve a

metabolização dos fosfolipídios de membrana pela fosfolipase A1 ou A2 (PLA1 ou PLA2) em lisofosfolipídios, os quais são convertidos em LPA pela autotaxina (ATX; Figura 3; revisado por AOKI *et al.*, 2004).

Figura 3 - Produção do ácido lisofosfatídico (LPA) a partir de fosfolipídios (PLs) de membrana. PLA1, fosfolipase A1; PLA2, fosfolipase A2; ATX, autotaxina.



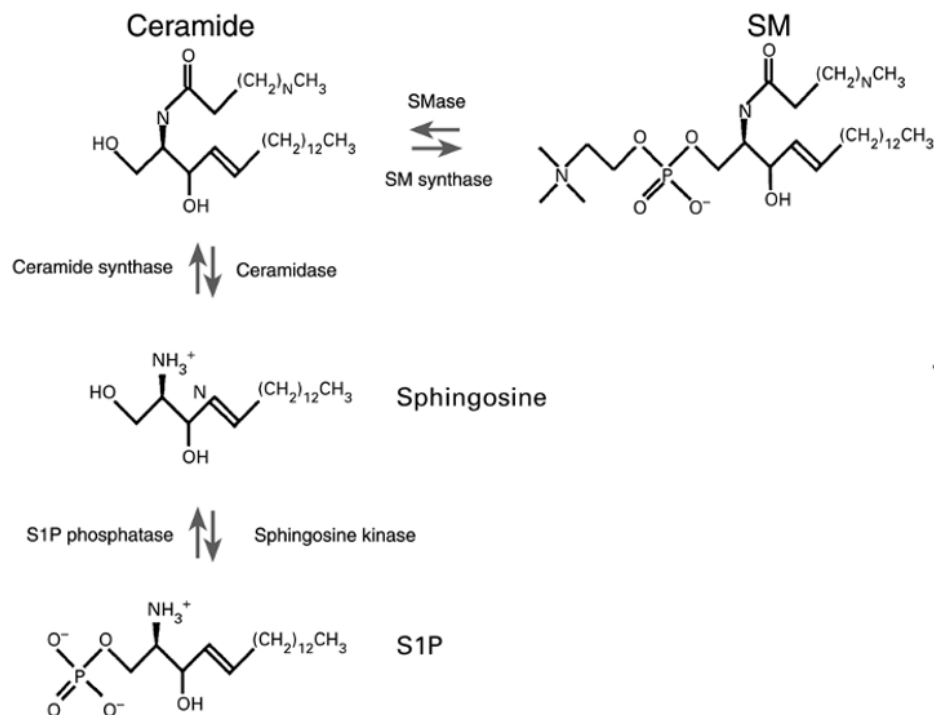
Fonte: AOKI, 2004.

O papel do LPA na maturação e competência oocitária tem sido extensivamente estudado. Boruszewska e colaboradores (2014) mostraram que o RNAm das enzimas envolvidas na síntese de LPA (PLA_2 e ATX) e dos receptores de LPA (LPAR_1 a LPAR_4) foram detectados nos oócitos bovinos, demonstrando que os COCs são potenciais fonte e alvo da ação do LPA. Estudos em roedores (HINOKIO *et al.*, 2002; KOMATSU *et al.*, 2006; JO *et al.*, 2014), bovinos (BORUSZEWSKA *et al.*, 2015) e suínos (ZHANG *et al.*, 2015) demonstraram que a suplementação do meio de maturação *in vitro* com LPA aumentou a taxa de maturação dos oócitos e a formação de blastocistos, assim como impactou a expressão genes marcadores de qualidade embrionária nos blastocistos. Adicionalmente, foi demonstrado que a exposição ao LPA durante a maturação reduziu o número de núcleos apoptóticos em COCs bovinos, diminuiu a expressão de BAX e estimulou a expressão de BCL_2 e de outros genes marcadores da

qualidade oocitária (*FST*, *GDF9* e *IGF2R*). Tais achados indicam que o LPA aumenta a viabilidade e competência do oócito (BORUSZEWSKA *et al.*, 2014; BORUSZEWSKA *et al.*, 2015).

Utilizando o modelo de diferentes tamanhos foliculares como critério para determinar a competência oocitária, Annes e colaboradores (2018) demonstraram uma maior expressão da espécie lipídica SM(16:0) em oócitos obtidos de folículos de 8,0 mm comparado com oócitos recuperados de folículos menores e, relacionaram esse achado com a melhor qualidade oocitária. A SM também é um lipídio de membrana que tem sido apontado como uma potente fonte de moléculas bioativas. Os produtos do metabolismo da SM, incluindo a ceramida, esfingosina e esfingosina-1-fosfato (S1P) desempenham papéis essenciais no crescimento, sobrevivência e morte celular. A S1P é produzida por fosforilação da esfingosina, a qual é mediada pela enzima esfingosina kinase 1 (SPHK1; Figura 4). Ao contrário da ceramida que permanece associada à membrana, a S1P é capaz de se difundir rapidamente entre as membranas e pode funcionar como um mediador lipídico intracelular ou como um efector extracelular (HANNUN *et al.*, 2001).

Figura 4 - Representação esquemática do metabolismo da esfingomielina (SM). SMase, esfingomielinase; S1P, esfingosina-1-fosfato.



Fonte: KOLESNICK, 2002.

Em roedores, a adição de S1P no meio de maturação *in vitro* preveniu a apoptose nos COCs maturados (PEREZ *et al.*, 2005) e afetou positivamente o desenvolvimento dos oócitos, aumentando a taxa de blastocistos e reduzindo os eventos apoptóticos nos blastocistos (JEE *et al.*, 2011). Em bovinos, a S1P protegeu os oócitos contra o choque térmico durante a maturação *in vitro*, impedindo a redução da taxa de clivagem e do desenvolvimento até o estágio de blastocisto, normalmente vistos em oócitos maturados sob condições de choque térmico (ROTH; HANSEN, 2004).

Apesar das evidências acima, que demonstram a importância dos lipídios de membrana no desenvolvimento oocitário, pouco se sabe sobre possíveis variações na composição lipídica de oócitos de doadoras de diferentes genótipos. Curiosamente, foi demonstrado por Silva-Santos e colaboradores (2014) que três espécies de PC [PC(P-36:2)+Na]⁺, [PC(38:2)+H]⁺ e [PC(38:5)+Na]⁺ foram mais abundantes em oócitos imaturos de fêmeas *Bos indicus* (Nelore) comparados com fêmeas 1/2 *indicus* x 1/2 *taurus* (Nelore x Angus). As PCs constituem a principal molécula fosfolipídica da membrana celular, sendo assim, estes resultados indicam a existência de diferenças estruturais nas membranas dos oócitos de fêmeas *Bos indicus* em comparação com as *indicus/taurus*. Os autores sugerem que a maior abundância das três espécies de PC em oócitos *Bos indicus* comparada com oócitos *indicus/taurus* pode estar relacionada com diferentes taxas metabólicas nestes oócitos, o que pode contribuir para a competência oocitária e para o desenvolvimento embrionário.

2.3 LIPÍDIOS DE RESERVA ENERGÉTICA E A COMPETÊNCIA OOCITÁRIA

Em adição aos seus papéis estruturais e de sinalização, os lipídios são importante fonte de energia celular. Os ácidos graxos livres são estocados como TAGs, os quais predominam o conteúdo de lipídios no citoplasma dos oócitos de mamíferos, formando as gotículas lipídicas, que são circundadas por uma monocamada de fosfolipídios e proteínas associadas (Mc EVOY *et al.*, 2000; STURMEY *et al.*, 2009; AARDEMA *et al.*, 2011; McKEEGAN; STURMEY, 2011). Os TAGs são cruciais para os oócitos e embriões devido a sua função como uma forma de estoque de energia (STURMEY *et al.*, 2009). Durante a maturação oocitária ocorre um aumento no metabolismo dos TAGs, na atividade da lipase e na β -oxidação mitocondrial, indicando que os oócitos podem usar os lipídios armazenados ao longo do seu crescimento como uma fonte de energia, proporcionando adequada geração de ATP para a síntese de proteínas e outras moléculas necessárias para a maturação, fecundação e clivagens iniciais (CETICA *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2001; TARAZONA *et al.*, 2006). De fato, Paczkowski e

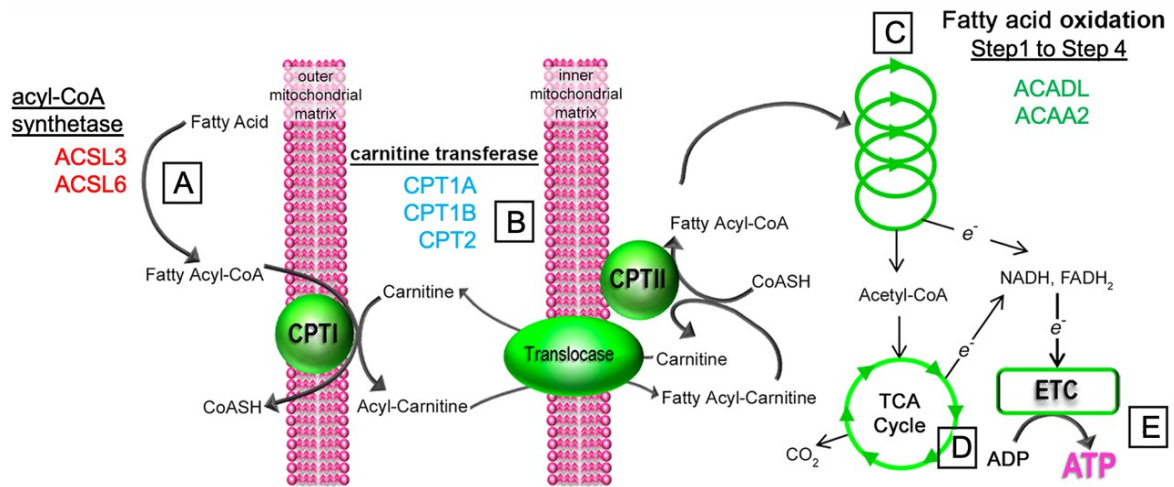
colaboradores (2013) demonstraram que a β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos no oócito é necessária para a completa maturação meiótica antes da fecundação.

A energia obtida dos ácidos graxos livres é produzida através da β -oxidação, um mecanismo que requer, primeiramente, a ativação dos ácidos graxos através da adição de um grupo coenzima-A (CoA) resultando na formação de acil-CoA (Figura 5A). Nas células animais, essa reação é catalisada principalmente pela família de enzimas acil-CoA sintetases de cadeia longa (ACSL; TOMODA *et al.*, 1991; SOUPENE; KUYPERS, 2008). Cinco genes da família ACSL foram identificados, sendo eles ACSL1 e ACSL3 a ACSL6 (TOMODA *et al.*, 1991).

Posteriormente, as carnitina-palmitoil transferases 1 e 2 (CPT1 e CPT2) e seu cofator carnitina são essenciais para o transporte dos ácidos graxos ativados (acil-CoA) para a mitocôndria (Figura 5B) para sofrerem a β -oxidação e, assim, produzirem ATP (BONNEFONT *et al.*, 2004). Interessantemente, foi demonstrado que a inibição da β -oxidação de ácidos graxos, utilizando um inibidor da atividade de CPT1 durante a maturação *in vitro*, compromete a maturação meiótica de oócitos bovinos e suínos (PACZKOWSKI *et al.*, 2013; BRISARD *et al.*, 2014). Em contraste, o estímulo da β -oxidação através da suplementação do meio de maturação *in vitro* com carnitina melhorou a competência oocitária e o desenvolvimento embrionário em bovinos (SUTTON-McDOWALL *et al.*, 2012).

No interior da mitocôndria os ácidos graxos ativados (acil-CoA) são β -oxidados em quatro etapas, quebrando sua estrutura de dois em dois carbonos, até convertê-los em acetil-CoA (Figura 5C), o qual segue para o ciclo do ácido tricarbóxico, necessário para a síntese de ATP. Foi demonstrado que as enzimas acil-CoA desidrogenase de cadeia longa (ACADL) e acetil-CoA aciltransferase 2 (ACAA2), as quais são necessárias, respectivamente, na primeira e quarta etapas da β -oxidação dos ácidos graxos, foram mais abundantes em COCs maturados *in vivo* quando comparado com COCs maturados *in vitro*. Portanto, a maior abundância de RNAm que codifica essas enzimas foi associada com a melhor competência para o desenvolvimento oocitário (YUAN *et al.*, 2011; DUNNING *et al.*, 2014b).

Figura 5 - Ativação de ácidos graxos de cadeia longa, entrada na mitocôndria e metabolismo via oxidação de ácidos graxos.



Fonte: Adaptado de DUNNING *et al.*, 2014b.

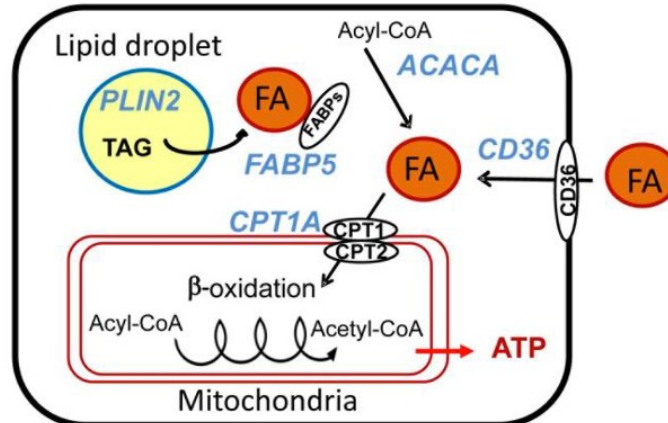
Legenda: **(A)** A entrada de ácidos graxos de cadeia longa na mitocôndria requer ativação por enzimas acil-CoA sintetases (ACSL) que catalisam a transferência de um grupo coenzima-A (CoA) para os ácidos graxos, resultando na formação de acil-CoA. **(B)** Os ácidos graxos ativados entram nas mitocôndrias através da ação das enzimas carnitina-palmitoil transferases 1 e 2 (CPT1 e 2). **(C)** Então, o acil-CoA graxo entra na espiral de oxidação de ácidos graxos que tem 4 etapas, as quais são catalisadas pelas enzimas 1) acil-CoA desidrogenase (ACAD), 2) enoil-CoA hidratase, 3) hidroxiacil-CoA desidrogenase e 4) acetil-CoA aciltransferase (ACAA2), formando acetil-CoA. **(D)** A acetil-CoA é capaz de entrar no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) que com a oxidação de ácidos graxos permite o escoamento de elétrons formando NADH e FADH₂, os quais doam elétrons para a cadeia transportadora de elétrons (ETC) que necessária para a síntese de ATP **(E)**.

Vários relatos na literatura indicam que os oócitos maturados *in vivo* são mais competentes para o desenvolvimento quando comparado com os oócitos maturados *in vitro* (VAN DE LEEMPUT *et al.*, 1999; RIZOS *et al.*, 2002; FARIN *et al.*, 2007). Sendo assim, a comparação desses dois grupos de oócitos se tornou um modelo para a avaliação dos mecanismos relacionados à competência. Neste sentido, foi demonstrado que a β -oxidação de ácidos graxos está diminuída em COCs maturados *in vitro* comparada com aqueles que maturam *in vivo*, diminuindo o nível adequado de ATP necessário para a completa maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário (DUNNING *et al.*, 2014a; DUNNING *et al.*, 2014b). A deficiente β -oxidação de ácidos graxos em COCs maturados *in vitro* é um dos possíveis mecanismos responsáveis pelo acúmulo de lipídios em oócitos maturados *in vitro* comparado com oócitos maturados *in vivo* (DEL COLLADO *et al.*, 2015; DEL COLLADO *et al.*, 2017). É importante mencionar que o acúmulo excessivo de lipídios pode exercer efeitos tóxicos nas funções celulares (lipotoxicidade), principalmente em células de tecidos não adiposos com limitada capacidade de estoque de lipídios (LISTENBERGER *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2014). Em especial, um alto nível de ácidos graxos saturados pode resultar em

lipotoxicidade por desencadear estresse no retículo endoplasmático, liberação mitocondrial de citocromo C e ativação da apoptose (LISTENBERGER *et al.*, 2001; MAEDLER *et al.*, 2001; COLL *et al.*, 2008; HENRIQUE *et al.*, 2010).

Além das enzimas diretamente relacionadas com a β -oxidação, outras enzimas, também envolvidas no metabolismo de ácidos graxos (Figura 6), já foram identificadas como marcadores de qualidade oocitária (SANCHES-LAZO *et al.*, 2014; DEL COLLADO *et al.*, 2015; UZBEKOVA *et al.*, 2015; DEL COLLADO *et al.*, 2017; BERTEVELLO *et al.*, 2018). A acetil coenzima-A carboxilase (ACACA) está envolvida na síntese de ácidos graxos, enquanto as proteínas de ligação aos ácidos graxos (FABP) estão envolvidas no transporte de ácidos graxos intra e extracelularmente. O receptor de trombospondina (CD36), também conhecido como ácido graxo translocase (FAT), está envolvido na entrada de ácidos graxos na célula. Por fim, a perilipina 2 (PLIN2) é uma importante proteína que está localizada na periferia das gotículas lipídicas, estando envolvida na função e manutenção da sua estrutura (Figura 6; McINTOSH *et al.*, 2012; WAN *et al.*, 2013; NAKAMURA *et al.*, 2014).

Figura 6 - Representação esquemática da função de enzimas importantes no metabolismo de ácidos graxos.



Fonte: UZBEKOVA *et al.*, 2015.

Legenda: **FA**, ácidos graxos; **TAG**, triacilglicerol; **ACACA**, acetil coenzima-A carboxilase; **FABP5**, proteína de ligação aos ácidos graxos 5; **CD36**, receptor de trombospondina; **PLIN2**, perilipina 2; **CPT1A**, carnitina-palmitoil transferase 1A.

O estudo do padrão de expressão desses genes envolvidos no metabolismo lipídico e, conhecidamente associados com a qualidade oocitária, assim como a composição lipídica em oócitos das raças Gir, Holandesa e mestiças 1/2 Holandês x 1/2 Gir podem contribuir para a elucidação dos mecanismos moleculares que estão envolvidos no melhor desempenho reprodutivo de determinadas raças doadoras. Tais conhecimentos podem auxiliar na

identificação de potenciais biomarcadores relacionados às diferenças na capacidade de desenvolvimento oocitário de doadoras de genótipos leiteiros *Bos taurus*, *Bos indicus* e *Bos taurus/indicus*.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar aspectos do lipidoma e da expressão gênica nos oócitos, buscando potenciais biomarcadores que possam estar relacionados às diferenças na capacidade de desenvolvimento oocitário de doadoras de genótipos leiteiros *Bos taurus*, *Bos indicus* e *Bos taurus/indicus*.

3.2 ESPECÍFICOS

São objetivos específicos do presente trabalho:

- a) avaliar o conteúdo de gotículas lipídicas citoplasmáticas dos oócitos imaturos derivados de vacas leiteiras das raças Gir, Holandesa e mestiça (1/2 Holandês e 1/2 Gir);
- b) avaliar o perfil lipídico por espectrometria de massas, em oócitos imaturos derivados de vacas leiteiras das raças Gir, Holandesa e mestiça (1/2 Holandês e 1/2 Gir);
- c) verificar a abundância do RNAm de genes envolvidos no metabolismo lipídico em oócitos imaturos e maturados *in vitro* derivados de vacas leiteiras das raças Gir, Holandesa e mestiça (1/2 Holandês e 1/2 Gir).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL E POPULAÇÃO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt) do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL, em parceria com o Laboratório de Produção de Embriões da Biotran Assessoria e Consultoria em Medicina Veterinária LTDA em Alfenas e a Metabolite Profiling Facility da Purdue University nos EUA.

As matrizes doadoras de oócitos das raças Gir, Holandesa e mestiça (1/2 Holandês e 1/2 Gir) utilizadas neste estudo ficavam em propriedades localizadas na região sul do estado de Minas Gerais, Brasil, a qual tem o clima temperado húmido, inverno seco e verão temperado (ALVARES *et al.*, 2013). As doadoras não foram submetidas a nenhum tipo de estímulo hormonal antes das aspirações foliculares. Foram utilizadas vacas não-lactantes, pluríparas das raças Gir (n=15), Holandesa (n=20) e mestiça (1/2 Holandês x 1/2 Gir; n=16) com escore de condição corporal variando de 3,5 - 4,5 (escala de 1 a 5; EDMONSON *et al.*, 1989). Todas as vacas estavam ciclando regularmente e livres de anormalidades clínicas e reprodutivas. Durante o período experimental as vacas foram mantidas em pastagem (*Brachiaria spp.*), suplementadas com silagem e concentrado proteico, com acesso livre à água e sal mineral.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas, Brasil (Protocolo 44/2016).

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Análise semiquantitativa das gotas lipídicas citoplasmáticas

Para a análise semiquantitativa das gotículas lipídicas dos oócitos, foram recuperados 30 COCs imaturos das doadoras de cada grupo experimental: Gir (GIR), 1/2 Holandês × 1/2 Gir (HOL×GIR) e Holandesa (HOL). Os COCs foram desnudados e os oócitos fixados e armazenados a 4°C para a quantificação do acúmulo lipídico citoplasmático, conforme metodologia descrita no item 4.5.

4.2.2 Análise do perfil lipídico por espectrometria de massas

Os COCs imaturos recuperados dos animais das raças Gir, Holandesa e mestiça (1/2 Holandês e 1/2 Gir) tiveram os oócitos separados das células do cumulus para a análise do perfil lipídico. Foram armazenados 6 *pools* de 5 oócitos das raças Holandesa (HOL) e 1/2 Holandês × 1/2 Gir (HOL×GIR) e 9 *pools* de 5 oócitos da raça Gir (GIR). As amostras, foram armazenadas em ultra freezer à -80°C para posterior extração da fração lipídica e análise do perfil lipídico, conforme metodologia descrita no item 4.6.

4.2.3 Análise de transcritos relacionados ao metabolismo lipídico

Os COCs imaturos e maturados *in vitro* dos animais das raças Holandesa, Gir e mestiça (1/2 Holandês e 1/2 Gir) tiveram os oócitos separados das células do cumulus para as análises de expressão gênica. Foram armazenados 4 *pools* de 25 oócitos para cada grupo experimental. As amostras foram armazenadas com tampão de lise, específico do kit de extração de RNA, em ultra freezer à -80°C até a extração do RNA, conforme metodologia descrita no item 4.7.

4.3 ASPIRAÇÃO FOLICULAR E RECUPERAÇÃO DOS COCS

O procedimento de aspiração folicular (“ovum pick up” – OPU) foi conduzido como descrito previamente por Bols *et al.*, (1997). As aspirações foram realizadas com pelo menos 14 dias de intervalo entre as sessões, até que todos os COCs necessários para todos os experimentos fossem coletados. Resumidamente, após anestesia epidural caudal (5 ml de lidocaína 1%; Dorfin®, Hertape, Juatuba, MG, Brasil) a aspiração folicular foi realizada utilizando-se aparelho de ultrassonografia e guia de aspiração com transdutor setorial intravaginal de 7,5 Mhz (Mindray DP2200, Mindray Medical International Ltd, Shenzhen, China). Foliculos com diâmetro superior a 3mm foram identificados e puncionados utilizando-se agulhas 18G e pressão de vácuo de 30 mmHg. O fluido folicular foi recuperado em tubos plásticos de 50 mL contendo 15 mL de meio Dullbeco tampão fosfato-salino modificado (DPBS; Nutricell, Campinas, SP, Brasil), suplementado com 125 UI/mL de heparina (Liquemine®; Roche Lab., São Paulo, SP, Brasil) aquecido a 37°C.

Após a punção, os COCs foram separados em filtro com malha de 80µm (Milipore, São Paulo, SP, Brasil) e morfologicamente classificados em quatro categorias, de acordo com Viana *et al.*, (2010).

- Grau 1: COC compacto, com mais de três camadas de células do cumulus e um oócito com citoplasma homogêneo.

- Viáveis: COC com uma a três camadas de células do cumulus e um oócito com citoplasma homogêneo ou ligeiramente heterogêneo, adequado para a produção *in vitro* de embriões.

- Degenerado: Oócitos desnudos ou parcialmente desnudos e/ou vacuolização do citoplasma e conseqüentemente, não adequado para a produção *in vitro* de embriões.

- Expandido: COC com expansão das células do cumulus.

Somente os COCs classificados como Grau 1 e Viáveis foram utilizados nas análises deste estudo.

Para as análises de quantificação das gotículas lipídicas, do perfil lipídico e de expressão gênica nos oócitos imaturos, os oócitos foram armazenados logo após o processo de aspiração. Para as análises de expressão gênica em oócitos maturados, os COCs recuperados foram maturados *in vitro* por 24 horas.

4.4 MATURAÇÃO IN VITRO

Os COCs recuperados na OPU foram transferidos em grupos de 25 para gotas de 150µL de meio de maturação constituído de TCM199 com bicabornato e sais de Earle's suplementado com 1 ug/mL de FSH (pFSH, Folltropin-V® Bioniche, ON, CA), 22 ug/mL de piruvato de sódio, 75 ug/mL de amicacina e 4 mg/mL de albumina sérica bovina. As gotas foram cobertas com óleo mineral e incubadas a 38,5°C em atmosfera umidificada e 5% de CO₂ durante 24 horas.

4.5 ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DAS GOTÍCULAS LIPÍDICAS CITOPLASMÁTICAS NOS OÓCITOS

Os oócitos imaturos obtidos de doadoras Gir, Holandesa e 1/2 Holandês e 1/2 Gir (n = 30 oócitos por grupo) foram corados com o corante lipofílico Sudan Black B, conforme descrito por Sudano *et al.*, 2012. Para tanto, os oócitos foram desnudos e fixados em solução de

formaldeído 4% por 2h em temperatura ambiente. Posteriormente, foram transferidos para gotas de etanol 50% por 2 min e, em seguida corados em solução de 1% de Sudan Black B (Sigma) diluído em etanol 70% por 2 min. Os oócitos foram então lavados em etanol 50% e finalmente colocados em lâminas contendo glicerol e cobertas com lamínulas. A análise foi realizada em microscópio óptico com aumento de 200x. Para estimar a quantidade relativa do conteúdo lipídico foram capturadas imagens de cada oócito e analisadas pelo software Image J 1.4. As imagens coloridas dos oócitos foram convertidas em escala de cinza. Os oócitos foram delimitados para obtenção da área e da média da intensidade de cinza e, então foi calculada a média da intensidade de cinza por área (intensidade de cinza/ μm^2).

4.6 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO NOS OÓCITOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Em preparação para a análise de espectrometria de massas, a fração lipídica das amostras de oócitos imaturos das diferentes raças foi extraída no LABAInt da UNIFAL-MG e enviada para a Metabolite Profiling Facility da Purdue University nos EUA, onde as análises foram executadas.

4.6.1 Extração de lipídios

Após a aspiração dos COCs, foram armazenados 6-9 *pools* de 5 oócitos imaturos para cada grupo experimental e destinados para estabelecimento do perfil lipídico. A fração lipídica dos *pools* de oócitos foi extraída de acordo com o protocolo de *Bligh & Dyer* (BLIG; DYER, 1959) adaptado para pequeno volume de acordo com de Lima *et al.*, (2018).

Em um microtubo contendo 5 oócitos foram adicionados 40 μL de água ultrapura e a mistura foi agitada no vortex para promover a lise celular. Em seguida, 90 μL de metanol e 50 μL de clorofórmio foram adicionados e misturados por pipetagem durante 15 segundos, formando uma solução de uma fase. Neste momento, as amostras foram incubadas durante 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, adicionaram-se mais 50 μL de água ultrapura e 50 μL de clorofórmio e as amostras foram misturadas por pipetagem e novamente incubadas durante 5 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 800xg durante 60 segundos para otimizar a separação das fases polar e apolar (solução bifásica). A fase superior da solução é a polar e a fase inferior é a apolar (orgânica), onde estão os lipídios.

Então, 80 μ L da fase apolar foram transferidos para um novo microtubo. A fase apolar foi seca em um evaporador do tipo *speedvac*, as amostras foram embaladas à vácuo e enviadas à temperatura ambiente para Metabolite Profiling Facility da Purdue University nos EUA, onde o extrato lipídico seco foi armazenado a -80°C até o momento da análise.

4.6.2 Espectrometria de massas utilizando o perfil de monitoramento de reações múltiplas

O perfil lipídico foi investigado utilizando a técnica de de monitoramento de reações múltiplas (MRM-*profiling*), segundo o protocolo descrito anteriormente por de Lima *et al.*, (2018) e Suarez-Trujillo *et al.*, (2021). O MRM é uma função altamente sensível de um espectrômetro de massas do tipo triploquadropolo, onde o primeiro quadropolo (Q1) isola um íon precursor de massa (m/z) conhecida. Este íon é então fragmentado no segundo quadropolo, e o terceiro quadropolo (Q3) é configurado para estabilizar o íon produto e permitir sua passagem para o detector. A combinação do íon precursor e do íon produto é chamada de transição, que é calibrada especificamente para cada composto de interesse. Este processo é feito em milissegundos e gera uma resposta bastante linear, com baixo ruído e alta sensibilidade.

Este experimento foi realizado em duas etapas, uma fase de descoberta (triagem exploratória) e uma fase de triagem específica. Na primeira etapa, um total de 1.174 transições de MRMs (isômeros constitucionais listados no banco de dados LipidMAPS para 6 subclasses lipídicas [PC, SM, PE, PI, PS, fosfatidilglicerol], além de ésteres de colesterol, ceramida, diacilglicerol e TAG) foram utilizadas para a triagem exploratória de uma amostra representativa composta por um *pool* de extratos lipídicos das três raças. Para preparar essa lista, os isômeros constitucionais foram combinados de maneira que apenas a classe lipídica, o número total de átomos de carbono nos ácidos graxos esterificados e o número de insaturações presentes na molécula foram listados, por exemplo, PC(34:1). Os TAGs foram monitorados usando o íon precursor e o íon produto relacionado à presença de resíduos de ácidos graxos específicos (C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2 e C20:4) e a sua identidade foi atribuída pelo número de carbonos totais nos ácidos graxos esterificados e o número total de insaturações, seguido pelo resíduo de ácido graxo específico, por exemplo, TAG(54:4)_FA18:2. As 1.174 transições foram organizadas em 10 métodos, cada um envolvendo 2 minutos de aquisição de dados, e cada um dos 10 métodos examinando um máximo de 200 transições.

Para compor a amostra representativa, uma quantidade de extrato lipídico equivalente a 5 oócitos foi utilizada para cada um dos 10 métodos criados. Esta amostra foi diluída em

acetonitrila + metanol + 300mM de acetato de amônia a 3: 6,65: 0,35 (v/v/v) e injetada em fluxo (8 µL) no espectrômetro de massas configurado para adquirir dados no modo MRM.

Na segunda etapa foram selecionadas apenas as transições que resultaram em intensidade de íons maior do que uma amostra utilizada como “branco” (solvente puro). Dessa forma, a lista de transições foi reduzida para 272 MRMs de interesse (Apêndice A). Esta lista final de transições de MRMs referentes à lipídios foi utilizada para interrogar pelo menos 6 repetições de cada raça.

As amostras de extrato lipídico de cada raça foram diluídas no solvente de injeção de fluxo (acetonitrila + metanol + 300 mM de acetato de amônia 3: 6,65: 0,35 [v/v/v]). O padrão interno, EquiSPLASH™ LIPIDOMIX® Quantitative Mass Spec Internal Standard (1:300, Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, EUA), foi adicionado em cada amostra na concentração de 1 ng. Todas as amostras (8 µL) foram entregues à fonte de ionização de um espectrômetro de massa Agilent 6410 QQQ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) utilizando um amostrador automático (G1377A). Entre as injeções de amostra, metanol puro foi injetado para remover quaisquer lipídios remanescentes antes da próxima injeção de amostra. Além disso, após cada 10 injeções de amostra, uma amostra de controle de qualidade contendo apenas os padrões lipídicos (EquiSPLASH™ LIPIDOMIX® Quantitative Mass Spec Internal Standard) a 1 ng foi injetada para monitorar o desempenho do instrumento.

Os resultados extraídos do espectrômetro de massas foram processados usando um *script* construído especialmente para obter a intensidade absoluta de cada íon das transições monitoradas. Os lipídios foram considerados presentes quando a intensidade de íons foi 1,3 vezes maior do que a intensidade de íons de uma amostra utilizada como branco (solvente puro), sendo assim, 179 MRMs relacionados à lipídios foram considerados presentes nos oócitos, os quais incluíram 69 PCs, 22 SMs, 12 PEs, 5 PIs, 6 ceramidas, 6 diacilgliceróis, 55 TAGs e 4 ésteres de colesterol. A concentração relativa de cada espécie lipídica monitorada foi calculada utilizando a razão entre a intensidade de íons da espécie lipídica e a intensidade de íons do padrão interno da mesma classe. Todas as espécies lipídicas detectadas na mesma classe foram somadas para obter a concentração total de cada classe.

4.7 PERFIL DE TRANSCRITOS RELACIONADOS AO METABOLISMO LIPÍDICO NOS OÓCITOS

Os oócitos oriundos de COCs imaturos e maturados *in vitro* foram mecanicamente separados das células do cumulus por sucessivas pipetagens em gotas de tampão fosfato-salino

(PBS). Os oócitos desnudos foram recuperados, lavados três vezes em PBS e, então armazenados em tampão de lise à -80°C até a extração do RNA.

O RNA total foi extraído de *pools* de 25 oócitos ($n=4$ *pools* para cada raça) utilizando o RNeasy® Micro Kit (Qiagen, Mississauga, Canada) de acordo com as instruções do fabricante e eluído em 20 μL de água livre de RNase. O RNA total (10 μL /reação) foi incubado com DNase I (1 IU/mg; Invitrogen, São Paulo, Brasil) para eliminação de possível contaminação com DNA genômico. Após esse procedimento, as amostras foram submetidas à reação de transcrição reversa usando *random* primers e High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (Applied Biosystem, Foster City, USA) de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. Os reagentes foram incubados a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min, e finalmente a 85°C por 5 min para inativação da enzima.

A abundância de transcritos dos genes alvo (*LRAT*, *ATX*, *PLA2*, *LPAR2*, *SPHK1*, *ACSL3*, *ACSL6*, *CPT1A*, *CPT1B*, *CPT2*, *ACADL*, *ACAA2*, *ACACA*, *FABP5*, *PLIN2*, *CD36*) nos oócitos das diferentes raças doadoras foi investigada por ensaio de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real utilizando o sistema Power Sybr®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) no ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram delineados a partir de sequências disponíveis no banco de dados GenBank e encontram-se listados na Tabela 1. As reações foram realizadas com um volume final de 25 μL e as condições para a amplificação dos genes foram: 95°C por 10 min (1 ciclo), desnaturação a 95°C por 10 seg, seguido pelo anelamento e extensão a 60°C por 1 min (40 ciclos). Os dados de fluorescência foram coletados ao final de cada extensão. As reações foram otimizadas a fim de propiciar máxima eficiência de amplificação para cada gene. Cada amostra foi analisada em duplicata e a eficiência e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores foram avaliadas pelas curvas de amplificação e dissociação, respectivamente.

Para selecionar o controle endógeno mais estável, os perfis de amplificação da peptidilprolil isomerase A (*PPIA*), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e histona H2AFZ (*H2AFZ*) foram comparados usando o aplicativo geNorm (Microsoft Excel; medgen.ugent.be/genorm; VANDESOMPELE *et al.*, 2002). O controle endógeno mais estável nos oócitos foi a *PPIA*.

Os valores de expressão relativa de cada gene alvo foram normalizados pela expressão do controle endógeno e calculados utilizando o método $\Delta\Delta\text{Ct}$ com correção da eficiência e utilizando uma amostra controle como calibradora (Pfaffl, 2001). Os valores médios de eficiência para cada gene foram calculados através do perfil de amplificação de cada amostra utilizando-se o programa LinRegPCR (RAMAKERS *et al.*, 2003).

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação pela PCR em tempo real.

Gene	Sequência	Tamanho do fragmento (bp)	Referência
<i>ACACA</i>	F: 5'-CTCCAACCTTCCTTCACTCCTTAG-3' R: 5'-ACATACTTCACTCCCTCGTAGA-3'	102	NM_174224.2
<i>PLIN2</i>	F: 5'-TAGACCAGTACCTCCCTCTTAC-3' R: 5'-ACTCGGCTTCTGAACCATATC-3'	86	NM_173980.2
<i>CD36</i>	F 5'- GCATCAGCAAGGCATTATAACC-3' R 5'- GAGCTGTAGAACGTGGAAGATAG-3'	116	BC103112.1
<i>PPIA</i>	F 5'- GCCATGGAGCGCTTTGG-3' R 5'-CCACAGTCAGCAATGGTGATCT-3'	65	NM_178320.2
<i>CPT1A</i>	F: 5'-TCCACGCCGTGAAGTATAAC-3' R: 5'-GGAATGTAAGGTGATGGGAAGA-3'	100	NM_001304989.1
<i>CPT1B</i>	F: 5'-CTGCTGAGAAGCACCAGAATA-3' R: 5'-GGTACTTGGAGACCACGTAAAG-3'	93	NM_001034349.2
<i>CPT2</i>	F: 5'-CCGTTCAGGACAACCTGGATAG-3' R: 5'-CATGTCTTCTAAGGCCTTCTCC-3'	98	NM_001045889.2
<i>ACADL</i>	F: 5'-CATCCATGACCAGTAGACATCTG-3' R: 5'-CCTCCCTTCCAGGTTGTATTT-3'	99	XM_027566474.1
<i>ACAA2</i>	F: 5'-CAGGGCTGAGTCTTAAGGATATG-3' R: 5'-CCCTCCATTCACATTGGTCTTA-3'	119	NM_001035342.2
<i>FABP5</i>	F: 5'-GGGAGAGAAGTTTGAAGAGACC-3' R: 5'-CCTTTCATCCCATTCCTGAT-3'	103	NM_174315.3
<i>ACSL3</i>	F: 5'-CCACAGACTTTAGCAGATCAGTCTT-3' R: 5'-CGATCCATGATTTCCGGGAC-3'	108	XM_027514648.1
<i>ACSL6</i>	F: 5'-GATGTCGAGGAACCTGAACACTAG-3' R: 5'-CTTTGTCCTCTCTGGGTCTTTC-3'	105	NM_001038042.2
<i>LRAT</i>	F: 5'-GAATGACAACACCACAGAATGAAG-3' R: 5'-GTGGTTGGAATAGGCCATAGAA-3'	104	NM_177503.2
<i>ATX</i>	F: 5'-ACCCCCTGATTGTCGATGTG-3' R: 5'-TCTCCGCATCTGTCCTTGGT-3'	120	NM_001080293.1
<i>PLA2</i>	F: 5'-CTGCGTGCCACAAAAGTGAC-3' R: 5'-TCGGGGGTTGAAGAGATGAA-3'	92	NM_001075864.1
<i>LPAR2</i>	F: 5'-TTCTATGTGAGGCGGCGAGT-3' R: 5'-AGACCATCCAGGAGCAGCAC-3'	161	NM_001192235.1
<i>SPHK1</i>	F: 5'-GATGGGAAGGGTGTGTTTACT-3' R: 5'-CTGACCATCCAGAAGTAGTTGG-3'	92	XM_027518615.1

Fonte: do autor.

Nota: F = forward primer; R = reverse primer; pb = pares de base.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A fim de testar os efeitos das diferentes raças doadoras sobre o conteúdo das gotículas lipídicas e a abundância de RNAm dos genes alvo nos oócitos, foi utilizada a seguinte sequência de análise:

1. Teste de normalidade dos dados e de homogeneidade de variâncias entre grupos com transformação para logaritmos se necessário para realização de análise paramétrica.
2. Os efeitos dos diferentes grupos foram testados por ANOVA ou análise não paramétrica (Kruskall-Wallis) caso a distribuição dos dados não tenha sido normal ou as variâncias dos grupos não tenham sido homogêneas.
3. Pós-testes (Tukey ou Dunn) foram utilizados para a comparação das médias quando foram indicadas diferenças por ANOVA ou Kruskall-Wallis, respectivamente.

As análises do perfil lipídico obtido por espectrometria de massas foram realizadas utilizando modelos estatísticos univariado e multivariado. Para estatística multivariada, a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foi realizada usando a plataforma MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>) para mostrar a relação entre a variância nos dados e as diferenças entre as raças. Com base nos resultados de carregamento do PLS-DA, as variáveis (ou seja, espécies lipídicas) mais importantes, que explicaram a maior variância dos dados (Importância Variável na Projeção; VIP), foram selecionadas e submetidas à ANOVA unidirecional seguida pelo pós-teste de Tukey utilizando o programa JMP (SAS Institute, version 7.0).

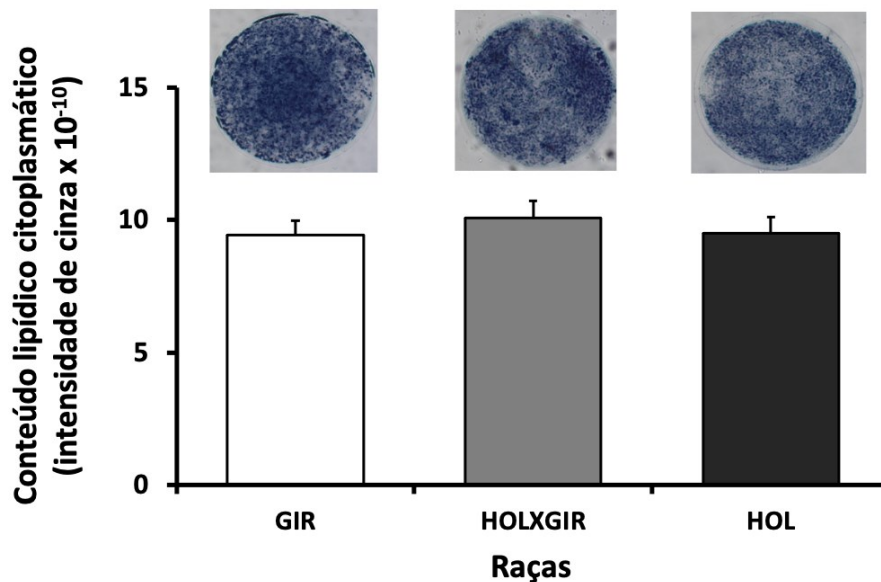
Os dados estão apresentados como média \pm S.E.M. e $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 CONTEÚDO DE GOTÍCULAS LIPÍDICAS CITOPLASMÁTICAS DO OÓCITO

A análise com o corante lipofílico Sudan Black B mostrou que os oócitos imaturos recuperados das doadoras Gir, Holandesa e mestiça (1/2 Holandês x 1/2 Gir) apresentaram conteúdo de gotículas lipídicas citoplasmática semelhante ($9,40 \pm 0,54$; $10,05 \pm 0,65$; $9,49 \pm 0,59$ intensidade de cinza por área, respectivamente; $P > 0,05$; Figura 7).

Figura 7 - Análise semiquantitativa do conteúdo lipídico citoplasmático de oócitos imaturos obtidos de doadoras Gir (GIR), 1/2 Holandês x 1/2 Gir (HOLxGIR) e Holandesa (HOL) expressa em intensidade de cinza por área (média \pm S.E.M.).



Fonte: do autor.

Nota: Estão apresentadas imagens representativas dos oócitos corados com Sudan Black B de cada grupo. N = 30 oócitos por grupo.

5.2 PERFIL LIPÍDICO NOS OÓCITOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A análise da concentração relativa de lipídios por classe mostrou que os triacilgliceróis (TAG) foram os lipídios mais abundantes nos oócitos, seguido pela fosfatidilcolina (PC), éster de colesterol, esfingomiélna (SM), fosfatidiletanolamina (PE), diacilglicerol, fosfatidilinositol (PI) e ceramida. A concentração de PC foi maior nos oócitos das doadoras Gir comparado com as Holandesas e mestiças, e a abundância de PE e SM também foi maior nos oócitos Gir

comparado com as Holandesas, enquanto as mestiças não diferiram das demais raças. Não houve diferença na concentração relativa de TAG, éster de colesterol, diacilglicerol, PI e ceramida nos oócitos das diferentes raças (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração relativa de cada classe lipídica monitorada nos oócitos imaturos obtidos de doadoras Gir (GIR), 1/2 Holandês x 1/2 Gir (HOLxGIR) e Holandesa (HOL).

Classe Lipídica	GIR (n=9)	HOLxGIR (n=6)	HOL (n=6)	<i>P</i>
Fosfatidilcolina, ng/oócito	8,81±0,45 ^A	6,87±0,20 ^B	6,54±0,40 ^B	0,001**
Fosfatidiletanolamina, ng/oócito	1,01±0,08 ^A	0,83±0,03 ^{AB}	0,71±0,07 ^B	0,02*
Fosfatidilinositol, ng/oócito	0,87±0,02	0,86±0,03	0,81±0,05	0,52
Esfingomielina, ng/oócito	1,98±0,12 ^A	1,63±0,06 ^{AB}	1,50±0,09 ^B	0,009**
Ceramida, ng/oócito	0,25±0,05	0,36±0,12	0,29±0,07	0,92
Diacilglicerol, ng/oócito	0,98±0,06	1,27±0,15	1,31±0,24	0,13
Éster de Colesterol, ng/oócito	2,08±0,18	4,10±1,39	2,45±0,39	0,64
Triacilglicerol, ng/oócito	12,42±0,70	16,78±2,64	14,78±2,78	0,29

Fonte: do autor.

Nota: Os dados estão apresentados como valores médios ± S.E.M.

A e B indicam diferenças entre as raças no pós-teste Tukey ($P < 0.05$).

A análise da proporção dos lipídios de membrana (PC, PE, PI e SM) revelou que 15 espécies lipídicas constituíram ~50% do total dos lipídios de membrana nos oócitos (Tabela 3). A espécie lipídica mais abundante foi a PC(34:1), que variou de 18% em oócitos de doadoras Gir, 12% em mestiças e 13% em Holandesas (Tabela 3).

Para rastrear os agrupamentos das amostras de oócitos das diferentes raças, o gráfico de pontuação da análise de PLS-DA foi gerado usando todas as variáveis lipídicas. Em relação aos lipídios de membrana, a análise de PLS-DA mostrou que houve estratificação entre as raças, com pouca sobreposição entre os grupos, indicando que a raça teve efeito no perfil dos lipídios de membrana nos oócitos imaturos (Figura 8). Com base nos resultados de carregamento da análise de PLS-DA, 32 potenciais espécies lipídicas, que explicaram a maior variância dos dados foram identificadas com base em valores VIP >1 (Figura 9) e submetidas à ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey. Destas, 19 foram diferentes entre os grupos, sendo consideradas espécies lipídicas importantes para a discriminação entre as raças (Tabela 4).

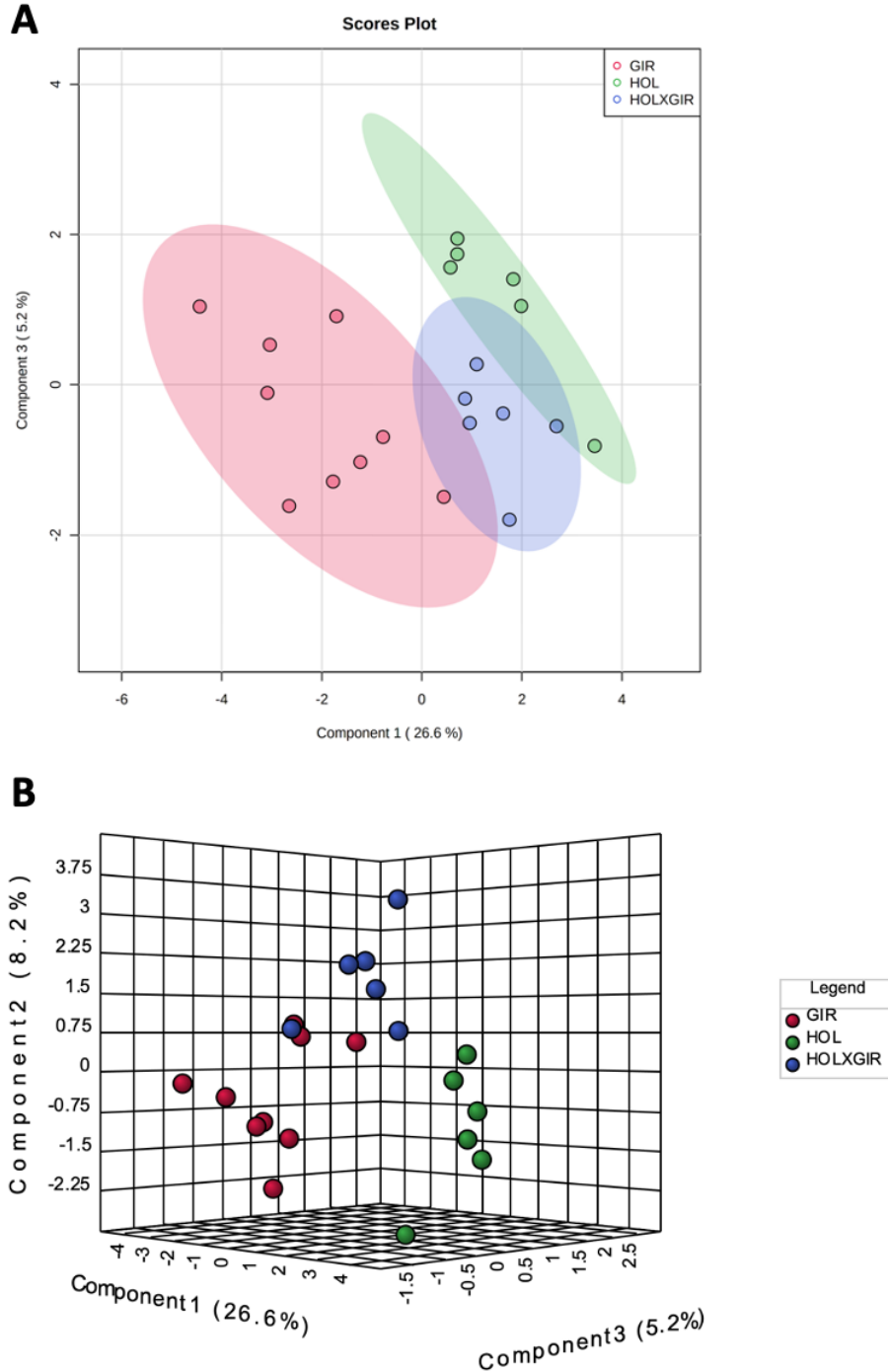
Tabela 3 - Proporção dos 15 lipídios de membrana mais abundantes, um em relação ao outro, nos oócitos imaturos obtidos de doadoras Gir (GIR), 1/2 Holandês x 1/2 Gir (HOLxGIR) e Holandesa (HOL).

Lipídio	GIR (%)	HOLxGIR (%)	HOL (%)
PC(34:1)	0,185	0,124	0,135
PC(32:1)	0,049	0,037	0,038
SM(d18:1/16:0)	0,041	0,036	0,038
SM(d18:0/20:0)	0,034	0,024	0,025
PC(34:2)	0,034	0,047	0,044
PC(30:1)	0,032	0,028	0,029
PC(36:2)	0,023	0,025	0,022
PC(36:4)	0,022	0,035	0,034
PC(34:0)	0,021	0,017	0,016
PC(36:3)	0,020	0,023	0,018
PE(36:2)	0,020	0,016	0,014
PC(34:4)	0,020	0,023	0,025
PC(30:0)	0,018	0,018	0,016
Lyso PC(20:3)	0,015	0,018	0,021
PI(38:3)	0,015	0,015	0,015

Fonte: do autor.

Nota: Nomenclatura lipídica: classe lipídica PC = fosfatidilcolina, Lyso PC = lisofosfatidilcolina, PE = fosfatidiletanolAMIna, PI = fosfatidilinositol, SM = esfingomielina. Dentro dos parênteses estão o número de carbonos totais seguido pelo número de insaturações nos grupos acil graxo (por exemplo, PC(34:4) indica 34 carbonos e 4 insaturações em ambos os grupos acil graxo.

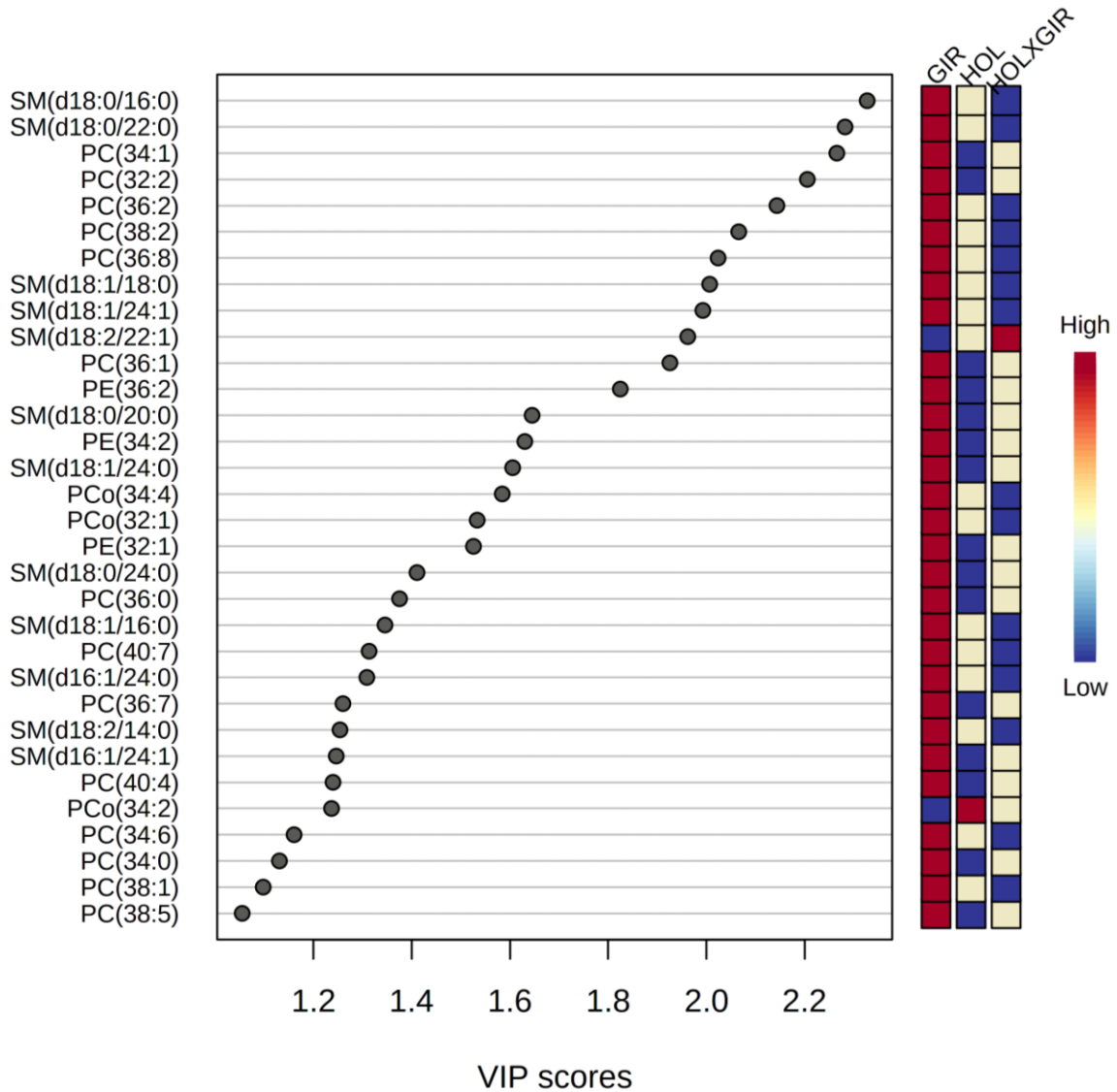
Figura 8 - Gráficos bidimensional (A) e tridimensional (B) da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para os perfis lipídicos incluindo, fosfatidilcolina (PC), esfingomiéline (SM), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) e ceramida dos oócitos imaturos das raças Gir (GIR), 1/2 Holandês x 1/2 Gir (HOLxGIR) e Holandesa (HOL; pools de cinco oócitos por réplica; n=6 – 9 por raça).



Fonte: do autor.

Nota: Os gráficos de PLS-DA foram elaborados com base na concentração individual das espécies lipídicas detectadas nas amostras. As tonalidades de cores nos gráficos da análise de PLS-DA representam as regiões de confiança de 95% para cada grupo.

Figura 9 - Espécies lipídicas que apresentaram scores de importância variável (VIP) > 1 identificadas pela análise de PLS-DA nos oócitos imaturos de doadoras das raças Gir (GIR), 1/2 Holandês x 1/2 Gir (HOLxGIR) e Holandesa (HOL).



Fonte: do autor.

Nota: Nomenclatura lipídica: classe lipídica PC = fosfatidilcolina, PCo = fosfatidilcolina com ligação éter, PE = fosfatidiletanolamina, SM = esfingomielina. Dentro dos parênteses estão o número de carbonos totais seguido pelo número de insaturações nos grupos acil graxo (por exemplo, PC(34:6) indica 34 carbonos e 6 insaturações em ambos os grupos acil graxo).

Dentre as 19 espécies lipídicas com diferença entre as raças, 4 PCs [PC(36:2), PC(38:2), PC(38:5) e PC(40:4)], 5 SMs [SM(d18:1/18:0), SM(d18:0/24:0), SM(d18:1/24:1), SM(d16:1/24:0) e SM(d16:1/24:1)] e 2 PEs [PE(34:2) e PE(36:1)] foram mais abundantes nos oócitos das doadoras Gir comparado com as Holandesas, enquanto as mestiças não diferiram das demais raças. Além disso, 5 PCs [PC(32:2), PC(34:0), PC(34:1), PC(36:0) e PC(36:8)], 2

SMs [SM(d18:0/16:0) e SM(d18:0/22:0)] e 1 PE [PE(36:2)] foram mais abundantes nos oócitos obtidos das vacas Gir em relação as Holandesas e mestiças (Tabela 4).

Tabela 4 - Espécies lipídicas diferencialmente expressas entre oócitos imaturos obtidos de doadoras Gir (GIR), 1/2 Holandês x 1/2 Gir (HOLxGIR) e Holandesa (HOL).

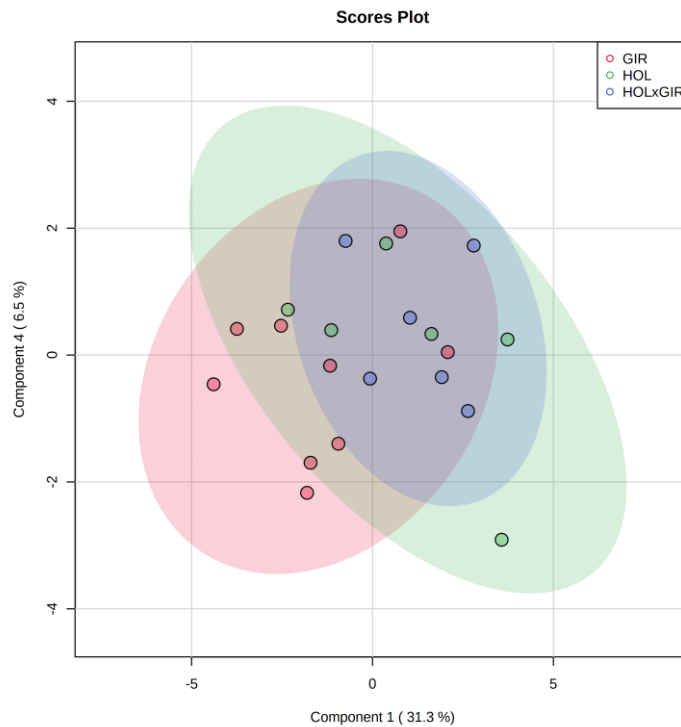
Espécie Lipídica	Conteúdo em ng/oócito			P
	GIR (n=9)	HOLxGIR (n=6)	HOL (n=6)	
PC(32:2)	0,171 ± 0,009 ^A	0,122 ± 0,008 ^B	0,115 ± 0,007 ^B	0,0003
PC(34:0)	0,481 ± 0,038 ^A	0,318 ± 0,016 ^B	0,287 ± 0,024 ^B	0,0006
PC(34:1)	4,329 ± 0,323 ^A	2,379 ± 0,105 ^B	2,427 ± 0,159 ^B	<0,0001
PC(36:0)	0,101 ± 0,007 ^A	0,059 ± 0,006 ^B	0,060 ± 0,007 ^B	0,0003
PC(36:2)	0,543 ± 0,043 ^A	0,481 ± 0,018 ^{AB}	0,300 ± 0,031 ^B	0,03
PC(36:8)	0,143 ± 0,008 ^A	0,110 ± 0,007 ^B	0,111 ± 0,010 ^B	0,01
PC(38:2)	0,130 ± 0,006 ^A	0,110 ± 0,008 ^{AB}	0,093 ± 0,009 ^B	0,008
PC(38:5)	0,275 ± 0,017 ^A	0,234 ± 0,013 ^{AB}	0,178 ± 0,014 ^B	0,001
PC(40:4)	0,067 ± 0,005 ^A	0,053 ± 0,005 ^{AB}	0,040 ± 0,005 ^B	0,03
SM(d16:1/24:0)	0,164 ± 0,009 ^A	0,135 ± 0,010 ^{AB}	0,125 ± 0,007 ^B	0,01
SM(d16:1/24:1)	0,113 ± 0,008 ^A	0,104 ± 0,005 ^{AB}	0,085 ± 0,008 ^B	0,05
SM(d18:0/16:0)	0,125 ± 0,005 ^A	0,096 ± 0,003 ^B	0,089 ± 0,006 ^B	<0,0001
SM(d18:0/22:0)	0,072 ± 0,005 ^A	0,050 ± 0,004 ^B	0,045 ± 0,004 ^B	0,002
SM(d18:0/24:0)	0,036 ± 0,002 ^A	0,027 ± 0,002 ^{AB}	0,026 ± 0,004 ^B	0,01
SM(d18:1/18:0)	0,150 ± 0,007 ^A	0,130 ± 0,007 ^B	0,100 ± 0,007 ^B	0,0005
SM(d18:1/24:1)	0,113 ± 0,006 ^A	0,096 ± 0,007 ^{AB}	0,082 ± 0,009 ^B	0,01
PE(34:2)	0,192 ± 0,021 ^A	0,134 ± 0,005 ^{AB}	0,122 ± 0,014 ^B	0,007
PE(36:1)	0,176 ± 0,012 ^A	0,140 ± 0,009 ^{AB}	0,116 ± 0,014 ^B	0,007
PE(36:2)	0,471 ± 0,053 ^A	0,312 ± 0,017 ^B	0,247 ± 0,025 ^B	0,0008

Fonte: do autor.

Nota: Os dados estão apresentados como valores médios ± S.E.M. A e B indicam diferenças entre as raças no pós-teste Tukey (P<0.05). Nomenclatura lipídica: classe lipídica PC = fosfatidilcolina, SM = esfingomielina, PE = fosfatidiletanolamina. Dentro dos parênteses estão o número de carbonos totais seguido pelo número de insaturações nos grupos acil graxo (por exemplo, PC(36:2) indica 36 carbonos e 2 insaturações em ambos os grupos acil graxo).

Na análise do perfil lipídico dos TAG, diacilglicerol e ésteres de colesterol não houve alteração entre as raças. No gráfico da análise de PLS-DA, observou-se sobreposição de amostras sem individualização de grupos entre as diferentes raças (Figura 10).

Figura 10 - Gráfico bidimensional da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para os perfis lipídicos incluindo, triacilglicerol (TAG), diacilglicerol e éster de colesterol de oócitos imaturos.



Fonte: do autor.

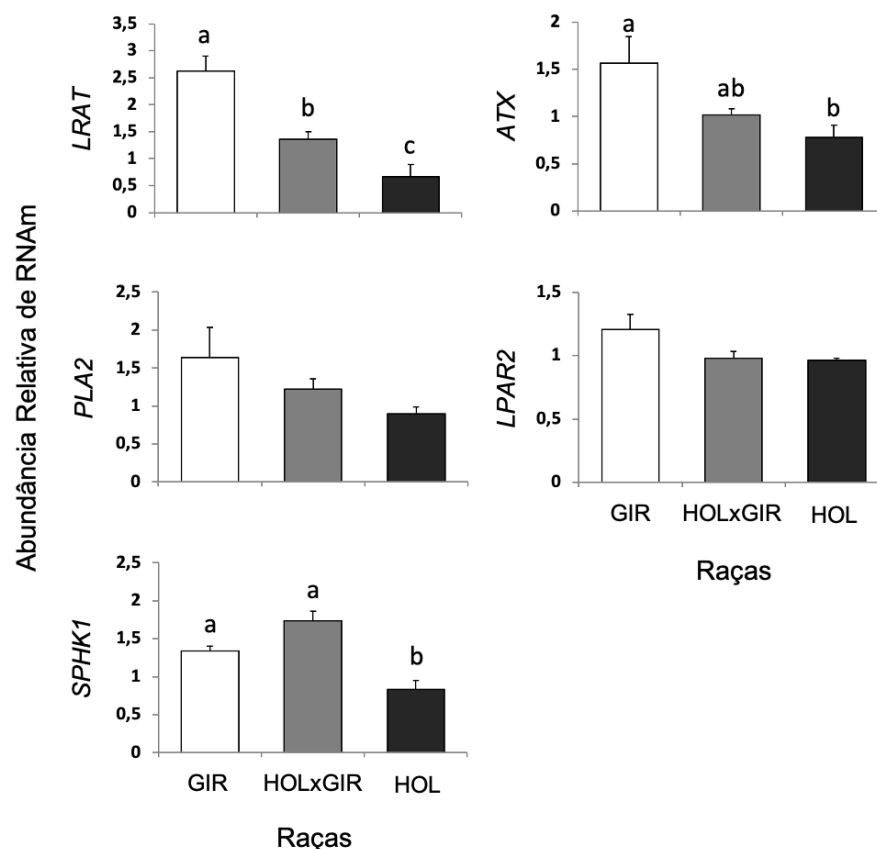
Nota: Raças Gir (GIR), 1/2 Holandês x 1/2 Gir (HOL) e Holandesa (HOL; pools de cinco oócitos por réplica; n=6 – 9 por raça). Os gráficos de PLS-DA foram elaborados com base na concentração individual das espécies lipídicas detectadas nas amostras. As tonalidades de cores nos gráficos da análise de PLS-DA representam as regiões de confiança de 95% para cada grupo.

5.3 PERFIL DE TRANSCRITOS RELACIONADOS AO METABOLISMO LIPÍDICO NOS COCS

Para obter mais informações sobre o metabolismo lipídico, utilizamos os dados obtidos através da análise do perfil lipídico dos oócitos das diferentes raças para direcionar os estudos de expressão gênica por PCR em tempo real. Sendo assim, a escolha dos alvos para a análise por PCR foi baseada nas diferenças de perfil lipídico obtidos por espectrometria de massas. Foram selecionados 5 genes, LRAT, ATX, PLA2, LPAR2 e SPHK1, os quais codificam enzimas importantes para a metabolização dos fosfolipídios de membrana e geração de metabólitos bioativos, e 11 genes (ACSL3, ACSL6, CPT1A, CPT1B, CPT2, ACADL, ACAA2, ACACA, FABP5, CD36 e PLIN2) diretamente relacionadas com a β -oxidação ou envolvidos no metabolismo de ácidos graxos.

Os resultados mostraram que o nível de RNAm da *SPHK1*, *ACSL3* e *CPT2* foi maior nos oócitos imaturos das doadoras Gir e mestiças comparado com as Holandesas (Figuras 11 e 12), enquanto a abundância do RNAm da *LRAT* foi maior nos oócitos imaturos dos animais Gir em relação as Holandesas, tendo os oócitos dos animais mestiços uma abundância intermediária de *LRAT* (Figura 11). A expressão de *ATX*, *CPT1B*, *ACADL* e *CD36* foi maior nos oócitos imaturos de Gir comparado com as Holandesas, enquanto as mestiças não diferiram das demais raças (Figuras 11 e 12). Não houve diferença no perfil de expressão dos genes *PLA2*, *LPAR2*, *ACSL6*, *CPT1A*, *ACAA2*, *ACACA*, *FABP5* e *PLIN2* nos oócitos imaturos das raças estudadas (Figuras 11 e 12).

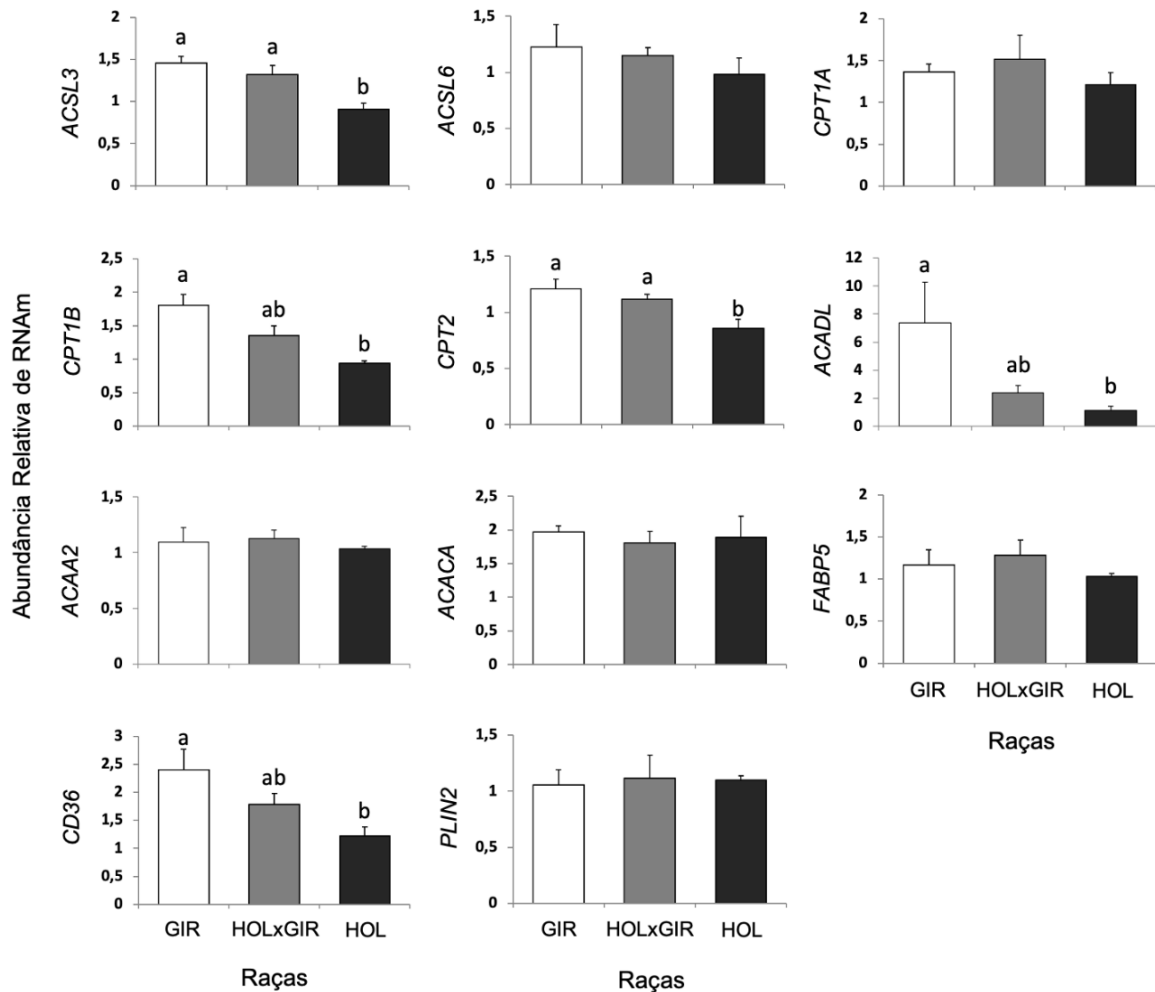
Figura 11 - Abundância de RNAm da *LRAT*, *ATX*, *PLA2*, *LPAR2* e *SPHK1* em oócitos imaturos de doadoras Gir (GIR), 1/2 Holandês x 1/2 Gir (HOLxGIR) e Holandesa (HOL).



Fonte: do autor.

Nota: A abundância de RNAm foi mensurada através da reação em cadeia da polimerase em tempo real. Os dados estão apresentados como valores médios (\pm S.E.M.) em relação à amostra calibradora e, foram calculados usando o método $\Delta\Delta C_t$ e normalizados pelo gene constitutivo peptidilprolil isomerase A (*PPIA*). As barras com diferentes letras indicam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Figura 12 - Abundância de RNAm da ACSL3, ACSL6, CPT1A, CPT1B, CPT2, ACADL, ACAA2, ACACA, FABP5, CD36 e PLIN2 em oócitos imaturos de doadoras Gir (GIR), 1/2 Holandês x 1/2 Gir (HOLxGIR) e Holandesa (HOL).



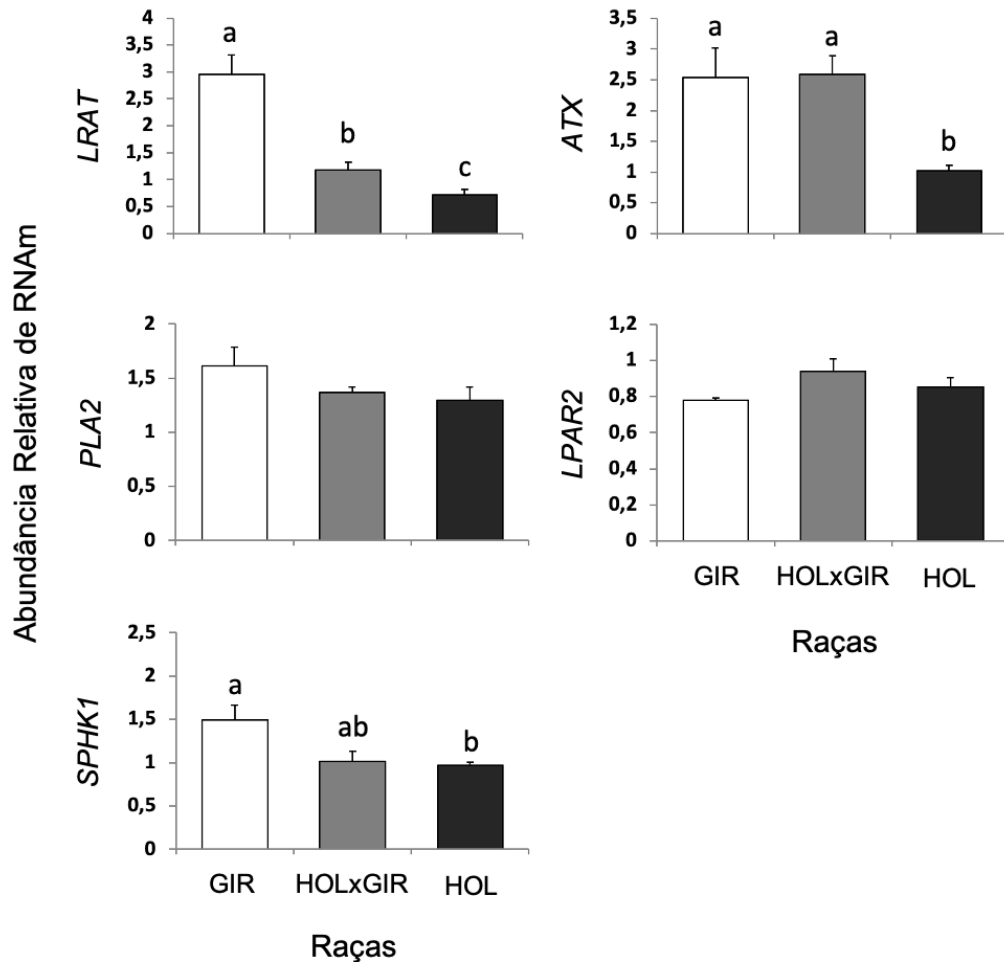
Fonte: do autor.

Nota: A abundância de RNAm foi mensurada através da reação em cadeia da polimerase em tempo real. Os dados estão apresentados como valores médios (\pm S.E.M.) em relação à amostra calibradora e, foram calculados usando o método $\Delta\Delta$ Ct e normalizados pelo gene constitutivo peptidilprolil isomerase A (*PPIA*). As barras com diferentes letras indicam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$). Os dados foram obtidos a partir de quatro réplicas para cada grupo experimental.

Em relação aos oócitos maturados *in vitro*, a abundância de *ATX*, *CPT1B* e *CD36* foi maior nos oócitos das vacas Gir e mestiças comparada com as Holandesas (Figuras 13 e 14), enquanto a abundância do RNAm da *LRAT* e *ACADL* foi maior nos oócitos dos animais Gir em relação as Holandesas, tendo os oócitos dos animais mestiços uma abundância intermediária (Figuras 13 e 14). Além disso, a expressão de *SPHK1* e *CPT1A* também foi maior nos animais Gir em relação aos Holandeses, enquanto as mestiças não diferiram das demais raças (Figuras 13 e 14). Por fim, os oócitos maturados *in vitro* das doadoras Holandesas e mestiças tiveram

um maior nível de RNAm que codifica a *PLIN2* em relação aos oócitos das vacas Gir (Figura 14).

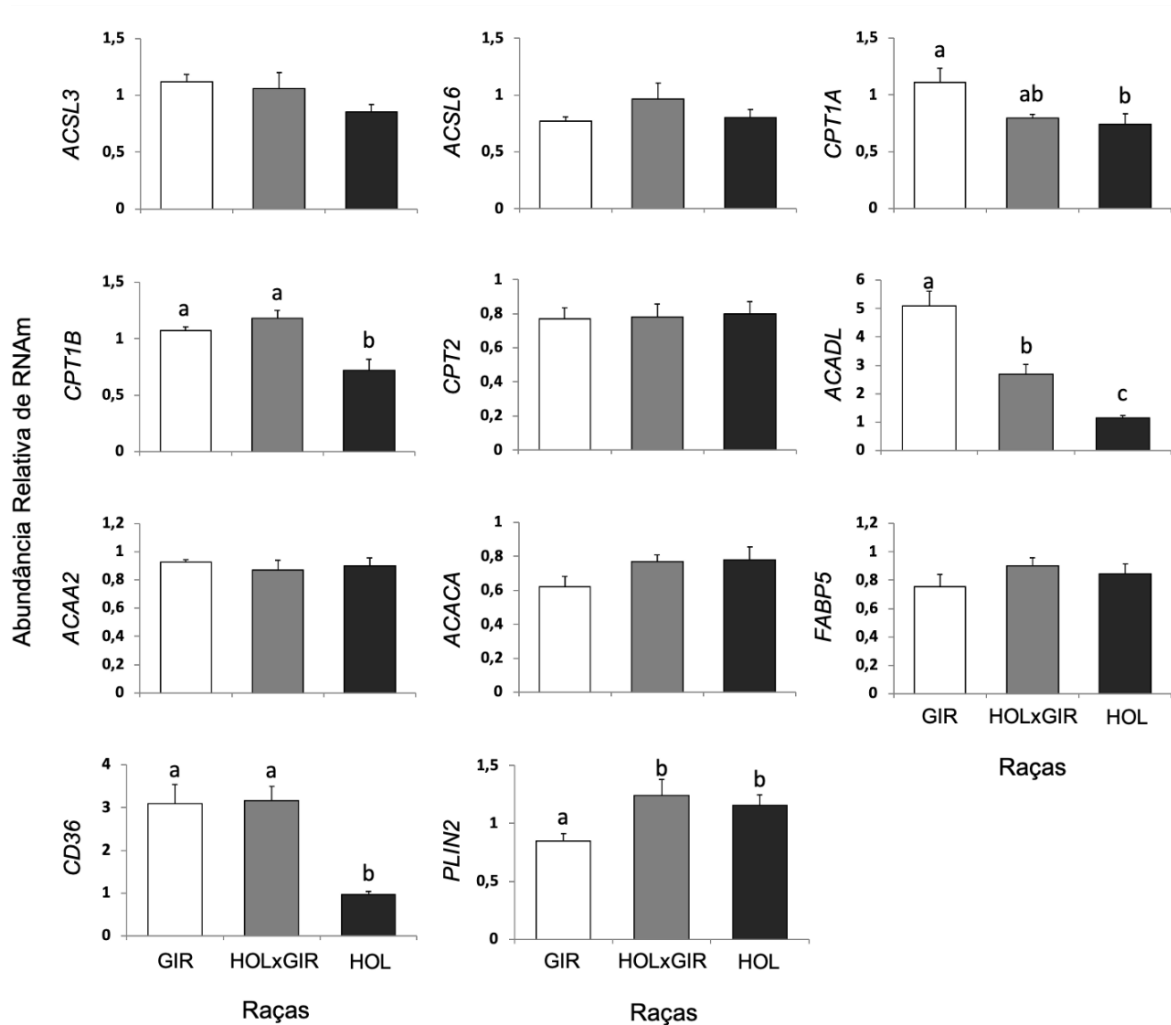
Figura 13 - Abundância de RNAm da LRAT, ATX, PLA2, LPAR2 e SPHK1 em oócitos maturados in vitro de doadoras Gir (GIR), 1/2 Holandês x 1/2 Gir (HOLxGIR) e Holandesa (HOL).



Fonte: do autor.

Nota: A abundância de RNAm foi mensurada através da reação em cadeia da polimerase em tempo real. Os dados estão apresentados como valores médios (\pm S.E.M.) em relação à amostra calibradora e, foram calculados usando o método $\Delta\Delta C_t$ e normalizados pelo gene constitutivo peptidilprolil isomerase A (*PPIA*). As barras com diferentes letras indicam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$). Os dados foram obtidos a partir de quatro réplicas para cada grupo experimental.

Figura 14 - Abundância de RNAm da ACSL3, ACSL6, CPT1A, CPT1B, CPT2, ACADL, ACAA2, ACACA, FABP5, CD36 e PLIN2 em óocitos maturados in vitro de doadoras Gir (GIR), 1/2 Holandês x 1/2 Gir (HOLxGIR) e Holandesa (HOL).



Fonte: do autor.

Nota: A abundância de RNAm foi mensurada através da reação em cadeia da polimerase em tempo real. Os dados estão apresentados como valores médios (\pm S.E.M.) em relação à amostra calibradora e, foram calculados usando o método $\Delta\Delta C_t$ e normalizados pelo gene constitutivo peptidilprolil isomerase A (*PPIA*). As barras com diferentes letras indicam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$). Os dados foram obtidos a partir de quatro réplicas para cada grupo experimental.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho fornecemos uma análise lipídica de oócitos recuperados por OPU das raças leiteiras Gir (*Bos indicus*), Holandesa (*Bos taurus*) e mestiça (1/2 Holandês x 1/2 Gir). As informações bioquímicas presentes nos espectros de massa e o uso de uma análise multivariada, em conjunto com dados de expressão gênica permitiram uma análise abrangente do metabolismo lipídico nos oócitos. Os perfis lipídico e transcricional dos oócitos puderam ser melhor discriminados entre as raças puras. Os oócitos da raça Gir, em comparação com os Holandeses, tiveram uma maior concentração de fosfolipídios de membrana. Tais oócitos apresentaram também maior abundância de transcritos que codificam enzimas importantes para a metabolização dos fosfolipídios e geração de moléculas bioativas conhecidamente relacionadas com a competência oocitária. Adicionalmente, os resultados de expressão gênica também sugerem que os oócitos das doadoras Gir tenham um mecanismo molecular que facilite a entrada de ácidos graxos na célula e a β -oxidação de ácidos graxos.

A análise lipídica através da espectrometria de massas, usando o perfil de MRM com a adição de padrões internos, possibilitou a quantificação relativa das espécies lipídicas monitoradas nos oócitos imaturos. Não houve diferença na concentração relativa de TAG, ésteres de colesterol, diacilglicerol, PI e ceramida nos oócitos. Entretanto, a concentração de PC foi maior nos oócitos das doadoras Gir comparado com as Holandesas e mestiças, e a abundância de SM e PE foi maior nos oócitos Gir comparado com as Holandesas, enquanto as mestiças não diferiram das demais raças (Tabela 2). Além disso, considerando os lipídios de membrana, a análise de PLS-DA mostrou que houve estratificação entre as raças, indicando que a raça teve efeito no perfil dos lipídios de membrana dos oócitos imaturos (Figura 8) e, a ANOVA determinou que 19 espécies lipídicas foram diferentes entre as raças (Tabela 4).

O conteúdo e o metabolismo lipídico influenciam a qualidade do oócito e, portanto, mudanças na composição lipídica do oócito podem ter um impacto significativo em funções biológicas cruciais para a aquisição da competência para sofrer a maturação completa e o desenvolvimento embrionário (CASTANEDA *et al.*, 2013; DUNNING *et al.*, 2014a; KAHN *et al.*, 2021). Os fosfolipídios PCs e SMs são as principais moléculas nas membranas celulares, regulando sua fluidez e permeabilidade (HANNUN *et al.*, 2001; KAHN *et al.*, 2021). Visto que elas estão concentradas no folheto externo da membrana plasmática e fornecem uma barreira para o ambiente extracelular, por muito tempo assumiu-se que a PC e SM desempenhavam apenas funções estruturais. Porém, nos últimos 20 anos a literatura tem mostrado que o metabolismo de tais fosfolipídios de membrana e seus metabólitos gerados, tais como

diacilgliceróis, ácidos graxos insaturados, ácido lisofosfatídico (LPA), ceramida, esfingosina e esfingosina-1-fosfato (S1P) são reconhecidos como mensageiros que desempenham papéis essenciais no crescimento, sobrevivência e morte celular (KOLESNICK, 2002; revisado por KAHN *et al.*, 2021). O papel desses derivados lipídicos na maturação e na competência para o desenvolvimento oocitário tem sido estudado em várias espécies de mamíferos (revisado por KAHN *et al.*, 2021).

O presente trabalho mostrou que a espécie lipídica predominante nos oócitos foi a PC(34:1) (Tabela 3). Este resultado é consistente com outros estudos nos quais a PC(34:1) foi observada entre os íons lipídicos mais abundantes em oócitos de mamíferos, tais como bovinos, ovelhas, cães e gatos (FERREIRA *et al.*, 2010; APPARICIO *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2020). Além disso, como mencionado, a concentração de PC total foi maior nos oócitos imaturos obtidos das doadoras Gir (Tabela 2). O maior nível de PC em oócitos já foi previamente associado com a qualidade oocitária (CHEN *et al.*, 2020).

Chen e colaboradores (2020) demonstraram que oócitos imaturos de melhor qualidade morfológica apresentaram maior abundância de PC quando comparado com oócitos de pior qualidade. Os autores discutem a importância deste resultado, considerando que a PC pode ser um substrato para a enzima lecitina retinol aciltransferase (LRAT) que catalisa a transferência de uma cadeia de ácido graxo da PC para o retinol, produzindo o éster de retinol. Sendo assim, a LRAT desempenha um papel fundamental na retenção e no armazenamento de vitamina A e controla a geração do ácido retinóico, um potente regulador da expressão de vários genes via receptores nucleares (GOLCZAK; PALCZEWSKI, 2010). É conhecido que a adição de ácido retinóico durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos e de roedores foi capaz de aumentar a taxa de maturação e a qualidade oocitária, impactando positivamente no desenvolvimento embrionário (DUQUE *et al.*, 2002; HIDALGO *et al.*, 2003; IKEDA *et al.*, 2005; NASIRI *et al.*, 2011).

Curiosamente, em associação com a maior concentração de PC nos oócitos imaturos das doadoras Gir, houve também uma maior expressão do RNAm que codifica a enzima *LRAT* nos oócitos imaturos e maturados *in vitro* dos animais Gir e mestiços em comparação com os Holandeses (Figuras 11 e 13). Tais resultados sugerem que a via de retenção e armazenamento de vitamina A esteja sendo favorecida nos oócitos dos animais Gir e mestiços. Provavelmente, em maior proporção nos oócitos dos animais Gir, nos quais além do maior nível de RNAm da enzima *LRAT*, houve também maior concentração de seu substrato, PC.

Os fosfolípidios de membrana, incluindo PC e PE, também são importantes substratos para a formação do LPA (AOKI *et al.*, 2004). O LPA é uma molécula sinalizadora que

desempenha um papel na promoção da maturação meiótica, reduz a apoptose em COCs e melhora a competência para o desenvolvimento embrionário em oócitos de roedores, bovinos e suínos (JO *et al.*, 2014; BORUSZEWSKA *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015). Os fosfolípidios de membrana são metabolizados pelas enzimas fosfolipase A2 (LPA2) e autotaxina (ATX) para a produção de LPA. Boruszewska e colaboradores (2014) mostraram que o RNAm das enzimas envolvidas na síntese de LPA (*PLA2* e *ATX*) e dos receptores de LPA (*LPAR1* a *LPAR4*) foi detectado nos oócitos bovinos, demonstrando que os oócitos são potenciais fonte e alvo da ação do LPA.

Apesar de não ter sido encontrada diferença na abundância do RNAm da *LPA2* e do *LPAR2* nos oócitos das diferentes raças, demonstramos que o nível de RNAm da *ATX* foi maior nos oócitos imaturos e maturados *in vitro* da raça Gir em relação aos da raça Holandesa (Figuras 11 e 13). Este é um resultado relevante, considerando que houve também uma maior concentração dos substratos PC e PE nos oócitos imaturos da raça Gir comparado com a Holandesa (Tabela 2). Em conjunto, tais resultados nos permitem inferir que uma maior quantidade de fosfolípidios de membrana possa estar sendo metabolizada para a geração de LPA nos oócitos das doadoras Gir.

É interessante mencionar ainda que a espécie molecular mais eficiente de LPA possui uma cadeia de acil graxo saturada 16:0 (palmitoil) ou insaturada 18:1 (oleoil) ligada à cadeia principal de glicerol (SANTOS *et al.*, 2006). Nossos resultados mostraram que a espécie lipídica predominante nos oócitos, a PC(34:1), a qual é formada pelas cadeias de acil graxo 16:0 e 18:1, foi 1,8 vezes maior nos oócitos Gir comparado com os oócitos Holandeses ($4,3 \pm 0,3$ versus $2,4 \pm 0,1$ ng/oócito, respectivamente; $P < 0,0001$; Tabela 4). Além disso, as três espécies de PE que tiveram maior concentração nos oócitos Gir em relação aos oócitos Holandeses, PE(34:2), PE(36:1) e PE(36:2) (Tabela 4) também contêm cadeias de acil graxo 18:1. Sendo assim, os oócitos Gir possuem uma maior concentração de substratos PC e PE para a produção de espécies de LPA altamente eficientes.

Nos oócitos imaturos das doadoras mestiças a concentração de PE, assim como a expressão do RNAm da *ATX* não diferiu das raças Gir e Holandesa, entretanto, nos oócitos maturados *in vitro* houve maior nível de RNAm da *ATX* tanto nas doadoras Gir como nas mestiças, em relação às Holandesas (Figura 13). Tal achado indica que, durante a maturação, os fosfolípidios de membrana possam estar sendo metabolizados com maior eficiência para a geração de LPA, não somente nos animais Gir, mas também nas doadoras mestiças.

Outra importante função do LPA está relacionada a sua capacidade de regular a expressão e atividade das enzimas ACSL3 e ACADL, as quais estão envolvidas na ativação e

β -oxidação de ácidos graxos e, são positivamente associadas com a competência oocitária (YUAN *et al.*, 2011; DUNNING *et al.*, 2014b; KAHN *et al.*, 2021). No presente trabalho encontramos um maior nível de RNAm da *ACSL3* nos oócitos imaturos (Figura 11) e *ACADL* nos oócitos imaturos e maturados *in vitro* obtidos dos animais Gir em comparação com os Holandeses (Figuras 11 e 13). A expressão aumentada dessas enzimas nos oócitos das doadoras Gir é mais um indício de que a via de geração de LPA a partir de fosfolipídios de membrana possa estar sendo positivamente regulada nos oócitos da raça Gir.

É conhecido que a utilização de ácidos graxos livres seja para a biossíntese de lipídios complexos (como os fosfolipídios e TAGs) ou para a β -oxidação mitocondrial requer a ativação do ácido graxo, o qual é conjugado com a CoA, formando acil-CoA (SOUPENE; KUYPERS, 2008; WEEDON-FEKJAER *et al.*, 2010). Nas células animais, essa reação é catalisada principalmente pela família das enzimas ACSL (TOMODA *et al.*, 1991). A literatura mostra que a enzima ACSL3 é especificamente necessária para a ativação de ácidos graxos que serão utilizados para a formação de fosfolipídios do tipo PC (YAO; YE, 2008). Portanto, o nível elevado do RNAm que codifica a enzima *ACSL3* nos oócitos das doadoras Gir pode ser um dos fatores que interferem na maior concentração de PC nesses oócitos.

Entre as classes lipídicas que diferiram entre as raças, é interessante notar também que a maior concentração da SM nos oócitos imaturos das doadoras Gir em comparação com as Holandesas (Tabela 2) pode ser um indicativo de oócitos de maior qualidade. Annes e colaboradores (2018) mostraram haver uma maior expressão da espécie lipídica SM(16:0) em oócitos imaturos derivados de folículos > 8 mm, os quais apresentam melhor qualidade e potencial para o desenvolvimento embrionário quando comparado com oócitos oriundos de folículos menores. Em adição a literatura relata que a regulação positiva da SM está associada à supressão da apoptose (HANNUN; OBEID, 2002; JUNG *et al.*, 2014).

Vários relatos sugerem que a SM apresenta alta afinidade com o colesterol (PATRA *et al.*, 1999; KOLESNICK *et al.*, 2000; SIMONS; IKONEN, 2000; KOLESNICK, 2002). O colesterol interage com o grupo principal da esfingosina através de ligações de hidrogênio, fornecendo um elemento extra de estabilidade para domínios de membrana enriquecidos com SM e colesterol, também chamados de jangadas lipídicas. Acredita-se que esses microdomínios de membrana funcionem como plataformas de sinalização que regulam a localização e as interações das proteínas (KOLESNICK *et al.*, 2000). Porém, a SM não influencia a sinalização apenas como um componente das jangadas lipídicas, ela é também um precursor de ceramida, esfingosina e SIP, metabólitos que desempenham papéis essenciais no crescimento, sobrevivência e morte celular (HANNUN *et al.*, 2001).

No presente trabalho, mostramos que os oócitos imaturos das doadoras Gir e mestiças tiveram um maior nível de RNAm da *SPHK1*. A enzima SPHK1 é necessária para a produção de S1P, um dos metabólitos da SM (KOLESNICK, 2002). A literatura mostra que a S1P atua prevenindo a apoptose durante a maturação *in vitro* de COCs de camundongos, além de afetar positivamente o desenvolvimento dos oócitos, aumentando a taxa de produção de blastocistos (PEREZ *et al.*, 2005; JEE *et al.*, 2011). Um estudo em bovinos demonstrou que o bloqueio da produção endógena de S1P durante a maturação reduziu a taxa de clivagem e o desenvolvimento dos blastocistos (ROTH; HANSEN, 2004). Além disso, Roth e Hansen (2004) mostraram que oócitos maturados com a adição de S1P sob condições de choque térmico (41°C) não tiveram redução da taxa de clivagem e do desenvolvimento embrionário, normalmente vistos quando a maturação é realizada em condições de estresse térmico. Portanto, os autores demonstraram que a S1P desempenha um importante papel na proteção dos oócitos durante o estresse térmico.

É amplamente conhecido que oócitos de animais *Bos taurus* são mais sensíveis ao estresse térmico do que oócitos de animais *Bos indicus*, indicando que há um efeito genético sobre o estresse térmico (PAULA-LOPES *et al.*, 2013). Considerando o papel da S1P na proteção durante o estresse térmico, podemos supor que a maior concentração do precursor da S1P, a SM, associada com o maior nível de RNAm que codifica a enzima *SPHK1* nos oócitos das doadoras Gir (Figuras 11 e 13), possam ser um dos mecanismos que promovam termoproteção, permitindo que os oócitos desses animais sofram menos efeitos do estresse térmico quando comparado com as fêmeas Holandesas.

Apesar dos oócitos das doadoras mestiças não terem apresentado uma maior concentração de SM, comparado com as doadoras Holandesas, eles tiveram um maior nível de RNAm que codifica a enzima *SPHK1* (Figura 11), sugerindo que os oócitos dos animais 1/2 Holandês x 1/2 Gir também apresentem um mecanismo termoprotetor mais eficiente que os oócitos das doadoras Holandesas.

Conforme apontado pelo gráfico da análise de PLS-DA, o perfil de TAG, diacilglicerol e éster de colesterol foi semelhante nos oócitos das doadoras de diferentes genótipos (Figura 10), assim como a concentração dessas classes lipídicas não diferiu entre as raças (Tabela 2). Considerando que os TAG e ésteres de colesterol são os principais lipídios armazenados nas gotículas lipídicas, tais resultados são consistentes com a análise do conteúdo das gotas lipídicas citoplasmáticas, a qual foi semelhante nos oócitos imaturos das doadoras Gir, mestiça e Holandesa (Figura 7).

Até onde sabemos este é o primeiro trabalho a investigar o conteúdo das gotículas lipídicas em oócitos imaturos de doadoras dos genótipos *Bos indicus*, *Bos taurus* e *Bos taurus/indicus*. Em oócitos maturados *in vitro*, Ordóñez-Leon e colaboradores (2014) mostraram haver uma maior quantidade de gotículas lipídicas em *Bos taurus* quando comparado com *Bos indicus*, enquanto os oócitos obtidos de animais mestiços (*Bos indicus* x *Bos taurus*) apresentaram um conteúdo intermediário de gotículas lipídicas. O mesmo trabalho, relacionou esse aumento do conteúdo lipídico durante a maturação com uma menor produção *in vitro* de embriões em *Bos taurus*. Os autores sugerem que esse acúmulo de lipídios nos oócitos dos animais *Bos taurus* durante a maturação *in vitro* possa ocorrer em virtude do oócito ser capaz de absorver lipídios do ambiente de cultura, ou ainda, ocorrer como resultado de uma diminuição na capacidade de metabolizar os lipídios através da β -oxidação (ORDÓÑEZ-LEON *et al.*, 2014).

Embora não tenha sido observada diferença no perfil e concentração dos principais lipídios de reserva energética nos oócitos imaturos dos diferentes genótipos, o padrão transcricional de enzimas importantes para o metabolismo de lipídios e geração de energia foi impactado pela raça.

Os relatos da literatura mostram que durante a maturação oocitária o conteúdo de TAG diminui e a atividade de β -oxidação mitocondrial aumenta, sugerindo que o estoque de gotículas lipídicas citoplasmática é utilizado como uma fonte de energia celular (KIM *et al.*, 2001; CETICA *et al.*, 2002; TARAZONA *et al.*, 2006; FAIR *et al.*, 2007). De fato, a redução na β -oxidação de ácidos graxos, utilizando um inibidor da atividade de CPT1 durante a maturação *in vitro*, compromete a maturação meiótica do oócito e a produção embrionária (FERGUSON; LEESE, 2006; PACZKOWSKI *et al.*, 2013; BRISARD *et al.*, 2014). A CPT1 e CPT2 são proteínas essenciais para o transporte dos ácidos graxos para a mitocôndria para sofrerem a β -oxidação e, assim, aumentar a disponibilidade de ATP na célula (YUAN *et al.*, 2013). Interessantemente, encontramos menor abundância do RNAm da *CPT1A*, *CPT1B* e *CPT2* nos oócitos imaturos e/ou maturados *in vitro* obtidos das doadoras Holandesas quando comparado com as doadoras Gir (Figuras 12 e 14), indicando que nas doadoras Holandesas o transporte de ácidos graxos para a mitocôndria possa ser comprometido.

Em adição o nível de RNAm que codifica as enzimas *ACSL3* e *ACADL* foi menor nos oócitos das doadoras Holandesas em relação às doadoras Gir (Figuras 12 e 14). De acordo com a função dessas enzimas, tais resultados sugerem que a ativação de ácidos graxos livres antes de seu transporte para a mitocôndria e a primeira etapa da β -oxidação dentro da mitocôndria também sejam comprometidas nos oócitos das vacas Holandesas.

Curiosamente, os oócitos maturados *in vitro* das doadoras Holandesas tiveram um maior nível de RNAm que codifica a proteína perilipina 2 (*PLIN2*) em relação aos oócitos das vacas Gir (Figura 14). A *PLIN2* é uma proteína localizada na superfície das gotículas lipídicas citoplasmáticas e está envolvida no processo de formação e acúmulo dessas gotículas (SASTRE *et al.*, 2014). Yang e colaboradores (2012) mostraram que oócitos de roedores maturados *in vitro* em condições que induziram o aumento no conteúdo de gotículas lipídicas apresentaram maior nível de RNAm para *PLIN2* e redução na taxa de maturação oocitária.

Portanto, a menor abundância de RNAm da *CPT1A*, *CPT1B*, *CPT2*, *ACSL3* e *ACADL* nos oócitos das doadoras Holandesas, indica que tais oócitos possam apresentar uma capacidade reduzida de metabolizar os lipídios através da β -oxidação mitocondrial. Tais resultados, em conjunto com um maior nível de transcritos da *PLIN2* nos oócitos maturados *in vitro* das doadoras Holandesas, corroboram o relato da literatura que mostra um acúmulo no conteúdo lipídico durante a maturação *in vitro* nos oócitos de vacas *Bos taurus* e explica, pelo menos em parte, a menor produção de embriões geralmente encontrada nesses animais (ORDONEZ-LEON *et al.*, 2014).

Por fim, a abundância de RNAm da *CD36* foi maior nos oócitos imaturos e maturados *in vitro* dos animais Gir, quando comparado com as doadoras Holandesas (Figuras 12 e 14). A proteína *CD36* está envolvida com a entrada de ácidos graxos de cadeia longa na célula e, ao aumentar a sua expressão, a entrada de ácidos graxos no oócito pode ser facilitada (UZBEKOVA *et al.*, 2015). Portanto, os resultados do presente estudo sugerem que os oócitos das doadoras Gir tenham um mecanismo molecular que facilite a entrada de ácidos graxos na célula e a subsequente β -oxidação de ácidos graxos para geração de energia na forma de ATP.

Não foi possível distinguir um padrão de expressão específico para os oócitos das doadoras 1/2 Holandês x 1/2 Gir em relação às raças puras, sendo que alguns genes que foram diferencialmente expressos entre os oócitos das raças Gir e Holandesa, não diferiram nos oócitos mestiços. Entretanto, o nível de transcritos da *ACSL3* e *CPT2* nos oócitos imaturos (Figura 12) e, *CPT1B*, *ACADL* e *CD36* nos oócitos maturados *in vitro* (Figura 14) obtidos dos animais mestiços foi maior comparado com os oócitos Holandeses. Estes resultados indicam que os animais mestiços também possuam um aparato molecular que favoreça a entrada e β -oxidação de ácidos graxos no oócito.

7 CONCLUSÃO

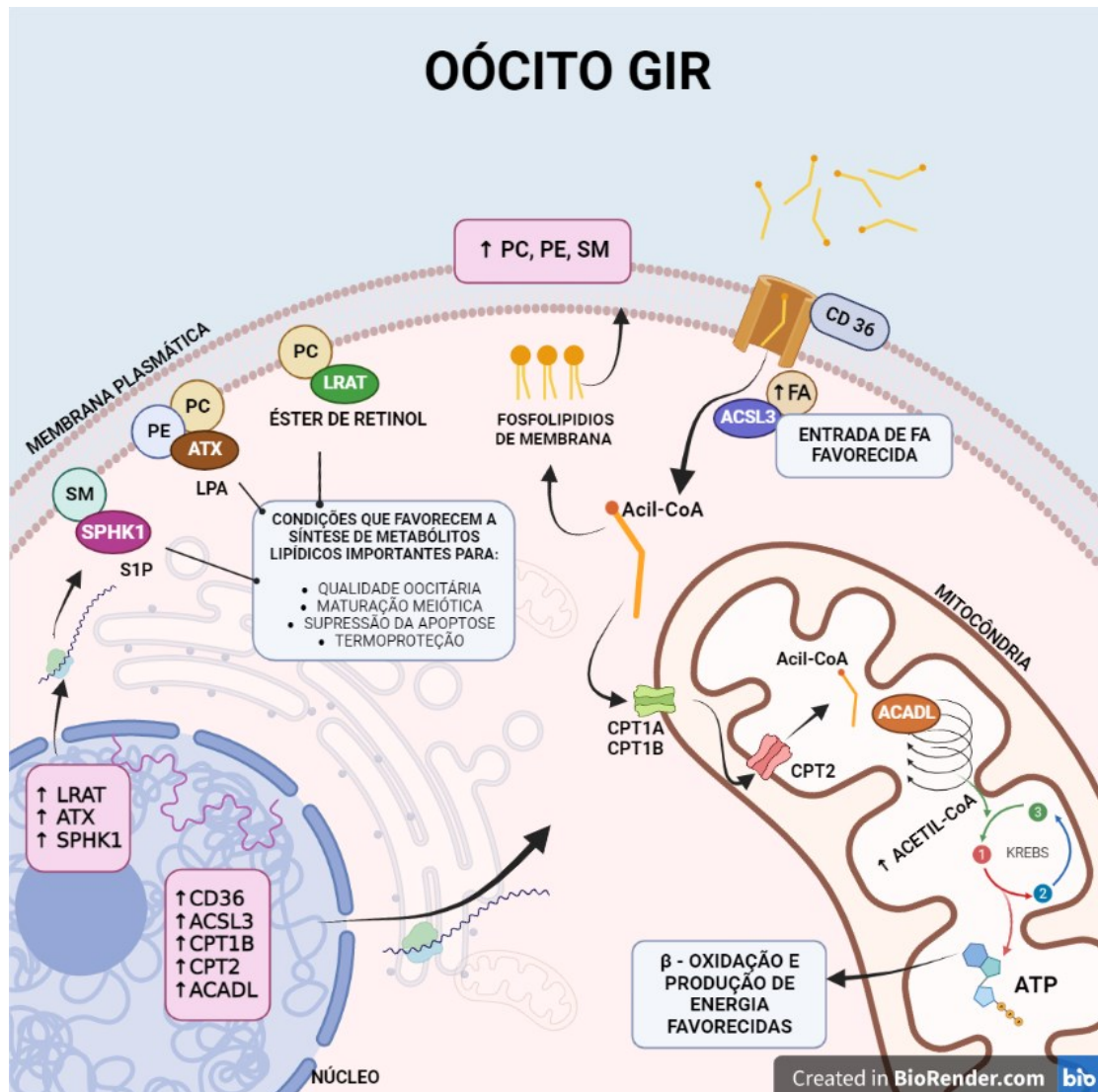
Nossos resultados demonstram que o perfil lipídico e a expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídios puderam ser mais claramente discriminados entre os oócitos das raças puras, Gir e Holandesa.

A maior concentração dos fosfolipídios de membrana, PC, PE e SM, nos oócitos dos animais Gir indicam a existência de diferenças estruturais nas membranas dos oócitos de fêmeas *Bos indicus* versus *Bos taurus*. Além disso, a maior expressão de genes que metabolizam os lipídios de membrana nos oócitos Gir aponta para diferentes condições metabólicas que favorecem a geração de mensageiros químicos importantes para o desenvolvimento oocitário nos animais Gir em relação aos Holandeses (Figura 15). Por fim, os resultados de expressão gênica também sugerem que os oócitos das doadoras Gir tenham um mecanismo molecular que facilite a entrada de ácidos graxos na célula e a β -oxidação de ácidos graxos, o que pode contribuir para a melhor competência oocitária e subsequente o desenvolvimento embrionário normalmente relatados para as doadoras Gir em relação às Holandesas (Figura 15). A Figura 15 ilustra de forma esquemática as principais conclusões deste trabalho.

Nos oócitos das doadoras mestiças, apesar de não haver uma maior concentração dos fosfolipídios de membrana em relação às doadoras Holandesas, alguns genes relacionados a metabolização dos lipídios de membrana e a β -oxidação de ácidos graxos foram mais abundantes, podendo contribuir para a melhor qualidade oocitária quando comparada com os oócitos de doadoras Holandesas.

Os dados gerados pelo presente estudo prospectam potenciais biomarcadores, os quais podem auxiliar futuras pesquisas que visam a identificação de alterações necessárias para a melhoria da eficiência do processo de PIVE em animais de diferentes grupamentos genéticos leiteiros.

Figura 15 - Representação esquemática dos principais resultados e conclusões fornecidas pelo presente trabalho.



Fonte: do autor.

Nota: A maior concentração de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e esfingomielina (SM) nos oócitos dos animais Gir, associada com a maior expressão de genes que metabolizam os lipídios de membrana, como: *LRAT*, *ATX* e *SPHK1*, indicam haver condições metabólicas que favoreçam a geração de mensageiros químicos importantes para o desenvolvimento oocitário nos animais Gir em relação aos Holandeses. O maior nível de RNAm codificado pelos genes *CD36*, *ACSL3*, *CPT1B*, *CPT2* e *ACADL* nos oócitos Gir sugerem que tais oócitos tenham um mecanismo molecular que facilite a entrada de ácidos graxos (FA) na célula e a β-oxidação de ácidos graxos para a produção de energia. ACADL, Acil-CoA desidrogenase de cadeia longa; ACSL3, Acil-CoA sintetases de cadeia longa 3; ATX, Autotaxina; CD36, Receptor de trombospondina; CPT1B, Carnitina Palmitoil Transferase 1B; CPT2, Carnitina Palmitoil Transferase 2; LPA, ácido lisofosfatídico; LRAT, Lecitina retinol aciltransferase; S1P, esfingosina-1-fosfato; SPHK1, Esfingosina kinase 1.

REFERÊNCIAS

- AARDEMA, H. *et al.* Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 85, p. 62–69, 2011.
- AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 390–396, 2002.
- ALVARES, C. A. *et al.* Climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22 p. 711–728, 2013.
- AMI, D. M. P. *et al.* FTIR spectral signatures of mouse antral oocytes: Molecular markers of oocyte maturation and developmental competence. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, p. 1220–1229, 2011.
- ANNES, K. 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.
- AOKI, J. Mechanisms of lysophosphatidic acid production. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 15, p. 477–489, 2004.
- APPARICIO, M. *et al.* Chemical Composition of Lipids Present in Cat and Dog Oocyte by Matrix-Assisted Desorption Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 113–117, 2012.
- BERTEVELLO, P.S. *et al.* Lipid Identification and Transcriptional Analysis of Controlling Enzymes in Bovine Ovarian Follicle. **International Journal of Molecular Sciences** v. 19, p. 3261, 2018.
- BEST, M. W. *et al.* A role for retinoids in human oocyte fertilization: regulation of connexin 43 by retinoic acid in cumulus granulosa cells. **Molecular Human Reproduction**, v. 21, p. 527–534, 2015.
- BLIGH, E. G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry Physiology**, v. 37, p. 911–917, 1959.
- BO, G.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 307–326, 2003.
- BOLS, P. E. J. *et al.* Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. **Theriogenology**, v. 47, p. 1221–1236, 1997.
- BONNEFONT, J. P. *et al.* Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 25, p. 495–520, 2004.

- BORUSZEWSKA, D. *et al.* The effect of lysophosphatidic acid during in vitro maturation of bovine oocytes: embryonic development and mrna abundances of genes involved in apoptosis and oocyte competence. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 670-670, 2014.
- BORUSZEWSKA, D. *et al.* The effect of lysophosphatidic acid during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes: cumulus expansion, glucose metabolism and expression of genes involved in the ovulatory cascade, oocyte and blastocyst competence. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, p. 13:44, 2015.
- BRISARD, D. *et al.* Tribbles expression in cumulus cells is related to oocyte maturation and fatty acid metabolism. **Journal of Ovarian Research**, v. 7, p. 7:44, 2014.
- CAMARGO, L. S. A. *et al.* Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos Taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, v. 68, p. 626–632, 2007.
- CASTANEDA, C. A. *et al.* Lipid content, active mitochondria and brilliant cresyl blue staining in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 79, p. 417–422, 2013.
- CETICA, P. *et al.* Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation *in vitro*. **Reproduction**, v. 124, p. 675–681, 2002.
- CHEN, Z. *et al.* Lipidomic profiling of dairy cattle oocytes by high performance liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry for developmental competence markers. **Theriogenology**, v. 144, p. 56–66, 2020.
- COLL, T. *et al.* Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 11107–11116, 2008.
- DE LIMA, C. B. *et al.* Comprehensive lipid profiling of early stage oocytes and embryos by MRM profiling. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 53, p. 1247–1252, 2018.
- DE ROOVER, R. *et al.* Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle in vitro embryo production. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 239–245, 2008.
- 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. 1721-1732, 2015.
- DEL COLLADO, M. *et al.* In vitro maturation impacts cumulus–oocyte complex metabolism and stress in cattle. **Reproduction**, v. 154, p. 881–893, 2017.
- DONNISON, M.; PFEFFER, P. L. Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantitation of their levels during development. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1813–1821, 2004.
- DUFOURC, E. J. Sterols and membrane dynamics. **Journal of Chemical Biology**, v. 1, p. 63–77, 2008.

- DUNNING, K. R.; RUSSELL, D. L.; ROBKER, R. L. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and b-oxidation. **Reproduction**, v. 148, p. 15–27, 2014a.
- DUNNING, K. R. *et al.* Regulation of Fatty Acid Oxidation in Mouse Cumulus-Oocyte Complexes during Maturation and Modulation by PPAR Agonists. **PLoS ONE**, v.9 p. e87327. 2014b.
- DUQUE, P. Enhancement of developmental capacity of meiotically inhibited bovine oocytes by retinoic acid. **Human Reproduction**, v. 17, p. 2706–2714, 2002.
- EDIDIN, M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, p. 414–418, 2003.
- EDMONSON, A. J. *et al.* A body condition scoring chart for holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 68–78, 1989.
- EMBRAPA. **ANUÁRIO Leite 2022: pecuária leiteira de precisão**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2022. Disponível em: <https://www.EMBRAPA.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1144110/anoario-leite-2022-pecuaria-leiteira-de-precisao>. Acesso em: 08 set. 2022.
- FAIR, T. *et al.* Global gene expression analysis during bovine oocyte *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v. 68, p. 91–97, 2007.
- FARIN, C. E. *et al.* The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 97–112, 2007.
- 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, C. R. *et al.* Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**, v. 51, p. 1218–1227, 2010.
- GOLCZAK, M.; PALCZEWSKI, K. An Acyl-covalent Enzyme Intermediate of Lecithin:Retinol Acyltransferase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 29217–29222, 2010.
- GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002.
- GONÇALVES, R. L. R.; VIANA, J. H. M. Current status of cattle embryo production in Brazil and in the world. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, p. 156–159, 2019.
- GONZÁLEZ-SERRANO, A. F. *et al.* Desorption electrospray ionization mass spectrometry reveals lipid metabolism of individual oocytes and embryos. **PLoS ONE**, v. 8, p.74981, 2013.

GOULART, I. L. *et al.* Embriões F1 (Hol X Gir) produzidos *in vitro* utilizados a fresco em rebanhos leiteiros comerciais e controlado. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 16, p. 77–82, 2009.

HANNUN, Y. A. L. C.; ARGRAVES, K. M. Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. **Biochemistry**, v. 40, p. 4893–4903, 2001.

HANNUN, Y.A.; OBEID, L. M. The Ceramide-centric Universe of Lipid-mediated Cell Regulation: Stress Encounters of the Lipid Kind. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 2779, p. 25847–25850, 2002.

HENRIQUE, C. *et al.* Increased mitochondrial fatty acid oxidation is suficiente to protect skeletal muscle cells from palmitate-induced apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 36818–36827, 2010.

HIDALGO, C. O. *et al.* Pregnancies and improved early embryonic development with bovine oocytes matured *in vitro* with 9-cis-retinoic acid. **Reproduction**, v. 125, p. 409–416, 2003.

HINOKIO, K. *et al.* Lysophosphatidic acid stimulates nuclear and cytoplasmic maturation of golden hamster immature oocytes *in vitro* via cumulus cells. **Life Science**, v. 70, p. 759–767, 2002.

IKEDA, S. *et al.* The Roles of Vitamin A for Cytoplasmic Maturation of Bovine Oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, p. 23–35, 2005.

JEE, B. C. *et al.* Dose-Dependent Effect of Sphingosine-1-Phosphate in Mouse Oocyte Maturation Medium on Subsequent Embryo Development. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 72, p. 32–36, 2011.

JO, J. W. *et al.* Addition of lysophosphatidic acid to mouse oocyte maturation media can enhance fertilization and developmental competence. **Human Reproduction**, v. 29, p. 234–41, 2014.

JUNG, J. *et al.* Analysis of the Phospholipid Profile of Metaphase II Mouse Oocytes Undergoing Vitrification. **PLoS ONE**, v. 9, p. 102620, 2014.

KAHN, R. *et al.* Role of lipid metabolism and signaling in mammalian oocyte maturation, quality, and acquisition of competence. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 639704, 2021.

KIM, J. *et al.* 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, H.; Ye, J. Cellular responses to excess fatty acids: focus on ubiquitin regulatory X domain-containing protein 8. **Current Opinion in Lipidology**, v. 25, p. 118–124, 2014.

KOLESNICK, R. N.; GONI, F. M.; ALONSO, A. Compartmentalization of Ceramide Signaling: Physical Foundations and Biological Effects. **Journal of Cellular Physiology**, v. 184, p. 285–300, 2000.

KOLESNICK, R. The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, p. 3–8, 2002.

KOMATSU, J. *et al.* The signaling pathways linking to lysophosphatidic acid-promoted meiotic maturation in mice. **Life Science**, v. 79, p. 506–511, 2006.

LISTENBERGER, L. L.; ORY, D.S.; SCHAFFER, J. E. Palmitate-induced apoptosis can occur through a cerAMide-independent pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 14890–14895, 2001.

LISTENBERGER, L. L. *et al.* Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 3077–3082, 2003.

LIU, K. *et al.* Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: New roles for an old timer. **Developmental Biology**, v. 299, p. 1–11, 2006.

LOPES, A. S. *et al.* Effect of days post-partum, breed and ovum pick-up scheme on bovine oocyte recovery and embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 196–203, 2006.

MADALENA, F.E.; PEIXOTO, M. G. C. D.; GIBSON, J. Dairy cattle genetics and its applications in Brazil. **Livestock Research for Rural Development**, v. 24, 2012. Disponível em: <http://www.lrrd.org/lrrd24/6/made24097.htm>. Acesso em: 08 ago. 2022.

MAEDLER, K. *et al.* Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. **Diabetes**, v. 50, p. 69–76, 2001.

McEVOY, T. G. *et al.* Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, p. 163–170, 2000.

McINTOSH, A. L. *et al.* Direct interaction of Plin2 with lipids on the surface of lipid droplets: A live cell FRET analysis. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 303, p. 728–742, 2012.

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

MONTANI, D. A. *et al.* The follicular microenvironment as a predictor of pregnancy: MALDI-TOF MS lipid profile in cumulus cells. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 29, p. 289–297, 2012.

MOSTAFA, S.; NADER, N.; MACHACA, K. Lipid Signaling During Gamete Maturation. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, p. 814–876, 2022.

NAKAMURA, M. T.; YUDELL, B. E. LOOR JJ. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 53, p. 124–144, 2014.

NASIRI, E. *et al.* The effect of retinoic acid on *in vitro* maturation and fertilization rate of mouse germinal vesicle stage oocytes. **Cell Journal(Yakhteh)**, v. 13, p. 19-24, 2011.

OLIVEIRA, C. S. *et al.* Oocyte origin affects the *in vitro* embryo production and development of Holstein (*Bos taurus taurus*) - Gyr (*Bos taurus indicus*) reciprocal cross embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 209, p. 106-165, 2019.

ORDOÑEZ-LEON, E. A. *et al.* Lipid droplet analysis using *in vitro* bovine oocytes and embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 306–314, 2014.

PACZKOWSKI, M. *et al.* 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. 111–116, 2013.

PATRA, S. K. *et al.* Liposomes containing sphingomyelin and cholesterol: detergent solubilization and infrared spectroscopic studies. **Journal of Liposome Research**, v. 9, p. 247–260, 1999.

PAULA-LOPES, F. F. *et al.* Physiology and Endocrinology Symposium: influence of cattle genotype (*Bos indicus* vs. *Bos taurus*) on oocyte and preimplantation embryo resistance to increased temperature. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 1143–1153, 2013.

PEREZ, G. I. *et al.* A central role for ceramide in the age-related acceleration of apoptosis in the female germline. **FASEB Journal**, v. 19, p. 860–862, 2005.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29, p. e45, 2001.

PONTES, J. H. F. *et al.* Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v. 74, p. 1349–1355, 2010.

RAMAKERS, C. *et al.* Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, p. 62–66, 2003.

RATH, D.; JOHNSON, L. A. Application and commercialization of flow cytometrically sexsorted semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 338–346, 2009.

RIZOS, D. *et al.* Consequences of Bovine Oocyte Maturation, Fertilization or Early Embryo Development *In Vitro* Versus *In Vivo*: Implications for Blastocyst Yield and Blastocyst Quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 234–248, 2002.

ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Sphingosine 1-Phosphate Protects Bovine Oocytes from Heat Shock During Maturation. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 2072–2078, 2004.

SALES, J. N. S. *et al.* Effects of a high-energy diet on oocyte quality and *in vitro* embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 3086–3099, 2015.

- SANCHES-LAZO, L. *et al.* Fatty acid synthesis and oxidation in cumulus cells support oocyte maturation in bovine. **Molecular Endocrinology**, v. 28, p. 1502–1521, 2014.
- SANTOS, W. L. *et al.* The molecular pharmacology of lysophosphatidate signaling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 905, p. 232–41, 2006.
- SARTORI, R. *et al.* Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2803–2812, 2002.
- SARTORI, R. *et al.* Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 13, p. 300–312, 2016.
- SASTRE, D. *et al.* Expression of PLIN2 and PLIN3 during oocyte maturation and early embryo development in cattle. **Theriogenology**, v. 81, p. 326–331, 2014.
- SATRAPA, R. A. *et al.* Influence of sire breed (*Bos indicus* versus *Bos taurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 76, p. 1162–1167, 2011.
- SILVA-SANTOS, K. C. *et al.* MALDI-MS lipid profiles of oocytes recovered by ovum pickup from *Bos indicus* and 1/2 *indicus* 1/2 *taurus* with high vs low oocyte yields. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 711–718, 2014.
- SIMONS, K.; IKONEN, E. How cells handle cholesterol. **Science**, v. 290, p. 1721–1726, 2000.
- SIQUEIRA, L. G. B. *et al.* Factores que afectan a la fecundación in vitro en bovinos. **Spermova**, v. 2, p. 10–12, 2012.
- SIRARD, M. A. *et al.* Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology** v. 65, p. 126–136, 2006.
- SOUPENE, E.; KUYPERS, F. A. Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, p. 507–521, 2008.
- STURMEY, R. G. *et al.* Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 50–58, 2009.
- SUAREZ-TRUJILLO, A. *et al.* Changes in sow milk lipidome across lactation occur in fatty acyl residues of triacylglycerol and phosphatidylglycerol lipids, but not in plasma membrane phospholipids. **Animal**, v. 15, p. 100–280, 2021.
- SUDANO, M. J. *et al.* Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* *in vitro*- and *in vivo*-produced blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 87, p. 130, 2012.
- SUTTON-McDOWALL, M. L. *et al.* Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. **Theriogenology**, v. 77, p. 1632–1641, 2012.

- TARAZONA, A. M. *et al.* Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 5-11, 2006.
- TOMODA, H. *et al.* Evidence for an essential role of long chain acyl-CoA synthetase in animal cell proliferation. Inhibition of long chain acyl-CoA synthetase by triacsins caused inhibition of Raji cell proliferation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 4214–4219, 1991.
- UZBEKOVA, S. *et al.* MALDI mass spectrometry imaging of lipids and gene expression reveals differences in fatty acid metabolism between follicular compartments in porcine ovaries. **Biology (Basel)**, v. 4, p. 216–236, 2015.
- VAN DE LEEMPUT, E. E. *et al.* Improvement of *in vitro* embryo development using *in vivo* matured oocytes from heifers treated for superovulation with a controlled preovulatory LH surge. **Theriogenology**, v. 52, p. 335–349, 1999.
- VAN HOECK, V. *et al.* Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology. **PLoS One**, v. 6, p.e23183, 2011.
- VAN, M.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 112-124, 2008.
- VANDESOMPELE, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, p. 0, 2002.
- VIANA, J. H. M. *et al.* Ovarian follicular dynAMICs, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. **Theriogenology**, v. 73, p. 966–972, 2010.
- VIANA, J. H. M. *et al.* Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 12–18, 2012.
- VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C.; SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v. 14, p. 476–481, 2017.
- VIANA, J. H. M. *et al.* A historical perspective of embryo-related technologies in South America. **Animal Reproduction**, v. 15, p. 63–970, 2018.
- VIANA, J. H. M. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, v. 38, p. 1–15, 2020.
- WAN, Z. *et al.* FAT/CD36 regulates PEPCK expression in adipose tissue. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 304, p. 478–484, 2013.
- WATANABE, Y. F. *et al.* Aspecto comercial de embriões produzidos *in vitro*. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas a reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 293-302.

WEEDON-FEKJAERMS *et al.* Activation of LXR increases acyl-CoA synthetase activity through direct regulation of ACSL3 in human placental trophoblast cells. **Journal of Lipid Research**, v. 51, p. 1886–1896, 2010.

WOLFENSON, D. *et al.* Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 1106–1113, 1995.

YANG, X. *et al.* Exposure to lipid-rich follicular fluid is associated with endoplasmic reticulum stress and impaired oocyte maturation in cumulus-oocyte complexes. **Fertility and Sterility**, v. 97, p. 1438–1443, 2012.

YAO, H.; YE, J. Long Chain Acyl-CoA Synthetase 3-mediated Phosphatidylcholine Synthesis Is Required for Assembly of Very Low Density Lipoproteins in Human Hepatoma Huh7 Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 849–854, 2008.

YUAN, Y. *et al.* Identification of developmental competence-related genes in mature porcine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, p. 565–575, 2011.

YUAN, H. X.; XIONG, Y.; GUAN, K. L. Nutrient sensing, metabolism, and cell growth control. **Molecular Cell**, v. 49, p. 379–387, 2013.

ZHANG, J.Y. *et al.* Lysophosphatidic acid improves porcine oocyte maturation and embryo development in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 82, p. 66–77, 2015.

APÊNDICE A – LISTA DE ÍONS PRECURSORES E ÍONS PRODUTOS

Nome do composto	Íon Precursor	Íon Produto
PC(30:0)	706,5	184,1
PC(30:1)	704,5	184,1
PC(30:2)	702,5	184,1
PC(32:0)	734,6	184,1
PC(32:1)	732,6	184,1
PC(32:2)	730,5	184,1
PC(32:3)	728,5	184,1
PC(34:0)	762,6	184,1
PC(34:1)	760,6	184,1
PC(34:2)	758,6	184,1
PC(34:3)	756,6	184,1
PC(34:4)	754,5	184,1
PC(34:5)	752,5	184,1
PC(34:6)	750,5	184,1
PC(36:0)	790,6	184,1
PC(36:1)	788,6	184,1
PC(36:2)	786,6	184,1
PC(36:3)	784,6	184,1
PC(36:4)	782,6	184,1
PC(36:5)	780,6	184,1
PC(36:6)	778,5	184,1
PC(36:7), PCo(36:0)	776,5	184,1
PC(36:8)	774,5	184,1
PC(38:1)	816,6	184,1
PC(38:2)	814,6	184,1
PC(38:3)	812,6	184,1
PC(38:4)	810,6	184,1
PC(38:5)	808,6	184,1
PC(38:6)	806,6	184,1
PC(38:7), PCo(38:0)	804,6	184,1
PC(38:8), PCo(38:1)	802,5	184,1

PC(38:9), PCo(38:2)	800,5	184,1
PC(40:0), PCp(42:6)	846,7	184,1
PC(40:10), PCo(40:3)	826,5	184,1
PC(40:3)	840,6	184,1
PC(40:4)	838,6	184,1
PC(40:5)	836,6	184,1
PC(40:6)	834,6	184,1
PC(40:7), PCo(40:0)	832,6	184,1
PC(40:8), PCo(40:1)	830,6	184,1
PC(42:6)	862,6	184,1
PC(52:4)	1006,8	184,1
PCo(32:0)	720,6	184,1
PCo(32:1)	718,6	184,1
PCo(32:2)	716,6	184,1
PCo(32:3)	714,5	184,1
PCo(34:0)	748,6	184,1
PCo(34:1)	746,6	184,1
PCo(34:2)	744,6	184,1
PCo(34:3)	742,6	184,1
PCo(34:4)	740,6	184,1
PCo(36:2)	772,6	184,1
PCo(36:3)	770,6	184,1
PCo(36:4)	768,6	184,1
PCo(36:5)	766,6	184,1
PCo(38:3)	798,6	184,1
PCo(38:4)	796,6	184,1
PCo(38:5)	794,6	184,1
PCo(38:6)	792,6	184,1
PCo(40:4)	824,6	184,1
PCo(40:5)	822,6	184,1
PCo(40:6)	820,6	184,1
PCp(36:5)	764,6	184,1
PCp(40:6), PC(38:0)	818,6	184,1
Lyso PC(14:0)	468,3	184,1

Lyso PC(16:0)	496.3	184,1
Lyso PC(16:1)	494.3	184,1
Lyso PC(17:1)	508.3	184,1
Lyso PC(18:0)	524.3	184,1
Lyso PC(18:1)	522.3	184,1
Lyso PC(18:2)	520.3	184,1
Lyso PC(20:3)	546.3	184,1
Lyso PC(20:4)	544.3	184,1
Lyso PC(22:5)	570.3	184,1
Lyso PC(22:6)	568.3	184,1
Lyso PC(6:0)	356.1	184,1
SM(d16:1/18:1)	701,6	184,1
SM(d16:1/22:1)	757,6	184,1
SM(d16:1/24:0)	787,7	184,1
SM(d16:1/24:1)	785,6	184,1
SM(d18:0/14:0)	677,6	184,1
SM(d18:0/16:0)	705,6	184,1
SM(d18:0/18:0)	733,6	184,1
SM(d18:0/20:0)	761,6	184,1
SM(d18:0/22:0)	789,7	184,1
SM(d18:0/24:0)	817,7	184,1
SM(d18:1/12:0)	647,5	184,1
SM(d18:1/14:0)	675,5	184,1
SM(d18:1/16:0)	703,6	184,1
SM(d18:1/18:0)	731,6	184,1
SM(d18:1/18:1)9Z))	729,6	184,1
SM(d18:1/20:0)	759,6	184,1
SM(d18:1/24:0)	815,7	184,1
SM(d18:1/24:1)15Z))	813,7	184,1
SM(d18:1/26:1)17Z))	841,7	184,1
SM(d18:2/14:0)	673,5	184,1
SM(d18:2/20:1)	755,6	184,1
SM(d18:2/22:1)	783,6	184,1
SM(d18:2/24:1)	811,7	184,1

PE(34:2)	716,5	575,5
PE(36:1)	746,5	605,5
PE(36:2)	744,5	603,5
PE(36:3)	742,5	601,5
PE(36:4)	740,5	599,5
PE(38:3)	770,5	629,5
PE(38:4)	768,5	627,5
PE(38:5)	766,5	625,5
PEo(34:1)	704,5	563,5
PEo(34:2)	702,5	561,5
PEo(36:2)	730,5	589,5
PEo(38:5)	752,5	611,5
PEo(38:6)	750,5	609,5
PG(32:0)	740,5	551,5
PG(32:1)	738,5	549,5
PG(34:0)	768,5	579,5
PG(34:1)	766,5	577,5
PG(34:2)	764,5	575,5
PG(36:1)	794,5	605,5
PG(36:2)	792,5	603,5
PG(36:3)	790,5	601,5
PG(36:8), PGo(36:1)	780,4	591,4
PI(34:0)	856,5	579,5
PI(34:1)	854,5	577,5
PI(34:2)	852,5	575,5
PI(36:1)	882,5	605,5
PI(36:2)	880,5	603,5
PI(36:3)	878,5	601,5
PI(36:4)	876,5	599,5
PI(38:2)	908,5	631,5
PI(38:3)	906,5	629,5
PI(38:4)	904,5	627,5
PI(38:5)	902,5	625,5
PI(40:4)	932,5	655,5

PI(40:5)	930,5	653,5
PIo(20:5)	632,3	355,3
PIo(38:3), PIp(38:2)	892,6	615,6
PIo(38:4), PIp(38:3)	890,5	613,5
PS(14:0)	470,2	285,2
PS(14:1)	468,2	283,2
PS(18:0)	526,3	341,3
PS(28:0)	680,4	495,4
PS(28:2)	676,4	491,4
PS(32:1)	734,4	549,4
PS(32:2)	732,4	547,4
PS(32:3)	730,4	545,4
PS(34:4)	756,4	571,4
PS(36:7)	778,4	593,4
PS(36:8)	776,4	591,4
PS(42:6)	864,5	679,5
PSo(18:0)	512,2	327,2
PSo(34:3)	746,5	561,5
PSp(30:1)	690,4	505,4
PSp(40:6), PS(38:0)	820,5	635,5
Cer(d18:0/24:0)	652,7	266,4
Cer(d18:0/26:0)	680,7	266,4
Cer(d18:1/16:0)	538,5	264,3
Cer(d18:1/24:0)	650,6	264,3
Cer(d18:1/24:1)	648,6	264,3
Cer(d18:1/26:0)	678,7	264,3
Cer(t18:0/16:0(2OH))	572,5	282,4
Cer(t18:0/18:0(2OH))	600,6	282,4
Cer(t18:0/22:0(2OH))	656,6	282,4
Cer(t18:0/26:0(2OH))	712,7	282,4
CerP(d18:0/16:0)	620,5	266,4
16:0 Cholesteryl ester	642,5	369,1
18:0 Cholesteryl ester	670,6	369,1
18:1 Cholesteryl ester	668,6	369,1

22:0 Cholesteryl ester	726,6	369,1
22:1 Cholesteryl ester	724,6	369,1
DG 16:0_16:0	586,5	313,5
DG 16:0_16:1	584,5	311,5
DG 16:0_16:2	582,5	309,5
DG 16:0_18:0	614,5	341,5
DG 16:0_18:1	612,5	339,5
DG 16:0_18:2	610,5	337,5
DG 18:0_16:0	614,5	313,5
DG 18:0_18:0	642,6	341,6
DG 18:1_16:0	612,5	313,5
DG 18:1_16:1	610,5	311,5
DG 18:1_18:0	640,6	341,6
TAG(48:0)_FA 16:0	824,8	551,8
TAG(48:0)_FA 18:0	824,8	523,8
TAG(48:1)_FA 16:0	822,8	549,8
TAG(48:1)_FA 16:1	822,8	551,8
TAG(48:1)_FA 18:1	822,8	523,8
TAG(48:2)_FA 16:0	820,8	547,8
TAG(48:2)_FA 18:1	820,8	521,8
TAG(48:2)_FA 18:2; TG 18:2_30:0	820,8	523,8
TAG(48:3)_FA 16:0	818,8	545,8
TAG(50:0)_FA 16:0	852,8	579,8
TAG(50:1)_FA 18:0	852,8	551,8
TAG(50:1)_FA 18:1	852,8	553,8
TAG(50:2)_FA 16:0	850,8	577,8
TAG(50:2)_FA 16:1	850,8	579,8
TAG(50:2)_FA 18:0	850,8	549,8
TAG(50:2)_FA 18:1	850,8	551,8
TAG(50:2)_FA 18:2	850,8	553,8
TAG(50:3)_FA 16:0	848,8	575,8
TAG(50:3)_FA 16:1	848,8	577,8
TAG(50:3)_FA 18:0	848,8	547,8
TAG(50:3)_FA 18:1	848,8	549,8

TAG(50:3)_FA 18:2	848,8	551,8
TAG(50:4)_FA 16:0	846,8	573,8
TAG(50:4)_FA 18:2	846,8	549,8
TAG(52:0)_FA 16:0	880,8	607,8
TAG(52:0)_FA 18:0	880,8	579,8
TAG(52:1)_FA 16:0	878,8	605,8
TAG(52:1)_FA 18:0	878,8	577,8
TAG(52:1)_FA 18:1	878,8	579,8
TAG(52:2)_FA 16:0	876,8	603,8
TAG(52:2)_FA 16:1	876,8	605,8
TAG(52:2)_FA 18:0	876,8	575,8
TAG(52:2)_FA 18:1	876,8	577,8
TAG(52:2)_FA 18:2	876,8	579,8
TAG(52:3)_FA 16:0	874,8	601,8
TAG(52:3)_FA 16:1	874,8	603,8
TAG(52:3)_FA 18:1	874,8	575,8
TAG(52:3)_FA 18:2	874,8	577,8
TAG(52:4)_FA 16:0	872,8	599,8
TAG(52:4)_FA 16:1	872,8	601,8
TAG(52:4)_FA 18:1	872,8	573,8
TAG(52:4)_FA 18:2	872,8	575,8
TAG(52:4)_FA 20:4	872,8	551,8
TAG(52:5)_FA 20:4	870,8	549,7
TAG(54:0)_FA 16:0	908,9	635,9
TAG(54:0)_FA 18:0	908,9	607,8
TAG(54:1)_FA 16:0	906,8	633,8
TAG(54:1)_FA 18:0	906,8	605,8
TAG(54:1)_FA 18:1	906,8	607,8
TAG(54:2)_FA 16:0	904,8	631,8
TAG(54:2)_FA 18:0	904,8	603,8
TAG(54:2)_FA 18:1	904,8	605,8
TAG(54:3)_FA 16:0	902,8	629,8
TAG(54:3)_FA 18:0	902,8	601,8
TAG(54:3)_FA 18:1	902,8	603,8

TAG(54:4)_FA 16:0	900,8	627,8
TAG(54:4)_FA 18:1	900,8	601,8
TAG(54:4)_FA 18:2	900,8	603,8
TAG(54:4)_FA 20:4	900,8	579,8
TAG(54:5)_FA 16:0	898,8	625,8
TAG(54:5)_FA 20:4	898,8	577,8
TAG(54:6)_FA 20:4	896,8	575,8
TAG(54:8)_FA 16:0	892,7	619,7
TAG(54:8)_FA 18:0	892,7	591,6
TAG(54:8)_FA 18:1	892,7	593,7
TAG(56:0)_FA 16:0	936,9	663,9
TAG(56:1)_FA 16:0	934,9	661,9
TAG(56:3)_FA 16:0	930,8	657,8
TAG(56:3)_FA 18:0	930,8	629,8
TAG(56:4)_FA 16:0	928,8	655,8
TAG(56:4)_FA 18:1	928,8	629,8
TAG(56:5)_FA 16:0	926,8	653,8
TAG(56:5)_FA 18:1	926,8	627,7
TAG(56:6)_FA 16:0	924,8	651,8
TAG(56:6)_FA 18:1	924,8	625,8
TAG(56:6)_FA 20:4	924,8	603,8
TAG(56:7)_FA 16:0	922,8	649,8
TAG(58:0)_FA 18:0	964,9	663,9
TAG(58:1)_FA 16:0	962,9	689,9
TAG(58:1)_FA 18:0	962,9	661,9
TAG(58:2)_FA 16:0	960,9	687,9
TAG(58:2)_FA 18:1	960,9	661,9
TAG(58:3)_FA 16:0	958,9	685,9
TAG(58:5)_FA 18:1	954,8	655,8
TAG(58:6)_FA 16:0	952,8	679,8
TAG(58:6)_FA 18:1	952,8	653,8
TAG(58:8)_FA 16:0	948,8	675,8
TAG(58:8)_FA 18:1	948,8	649,8
TAG(60:1)_FA 16:0	990,9	717,9

TAG(60:6)_FA 16:0	980,9	707,9
TAG(60:7)_FA 16:0	978,9	705,9
TAG(60:8)_FA 16:0	976,9	703,9