PERSPECTIVAS PARA A APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA CARACTERIZAÇÃO DO LIPIDOMA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO

Christina Ramires Ferreira[1,2], Rodrigo Ramos Catharino[2], Sérgio Adriano Saraiva[2], Maria Francesca Riccio Fonsêca[2], Andréa Cristina Basso[1], José Henrique Fortes Pontes [1], José Carlos Ereno Júnior[1], Marcos Nogueira Eberlin[2]

[1]In Vitro Brasil Ltda, Mogi Mirim-SP; [2]Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas-SP.

Introdução

Embora vários protocolos de criopreservação para embriões bovinos produzidos *in vitro* tenham sido desenvolvidos e aplicados com sucesso, a eficiência do procedimento apresenta desafios para o emprego da técnica em escala comercial. A criosensibilidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro* tem sido relacionada principalmente ao alto conteúdo de lipídeos acumulados durante o processo de cultivo *in vitro*. O melhor conhecimento da composição lipídica (ou lipidoma) de embriões bovinos pode levar a avanços nas estratégias já utilizadas para melhorar a eficiência do processo. A técnica de espectrometria de massas (MS) é utilizada com sucesso para estudos de lipidoma de células e tecidos. O objetivo deste trabalho é relatar a utilização de Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser - Tempo-de-Vôo (MALDI-TOF MS) para obtenção de perfis lipídicos de oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Material e Métodos

Oócitos e embriões tiveram a zona pelúcida removida em pronase 0,5% (w/v), foram acondicionados em microtubos contendo 50µL de solução 1:1 (v/v) metanol/água ultrapura e estocados a 4ºC por no máximo 7 dias. Os embriões e oócitos foram colocados sobre uma placa de MALDI (Waters, Manchester,UK) e posteriormente recobriu-se as amostras com a matriz ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB). Para coleta dos espectros foi utilizado um equipamento MALDI-TOF (Micromass. Manchester, UK) no intervalo de *m/z* de 600 a 1200, voltagem de pulso 2500V; reflectron 2000V, fonte 15000V e MCP 2100V. Os espectros foram processados no software MassLynx v4.0 (Waters, Manchester, UK).

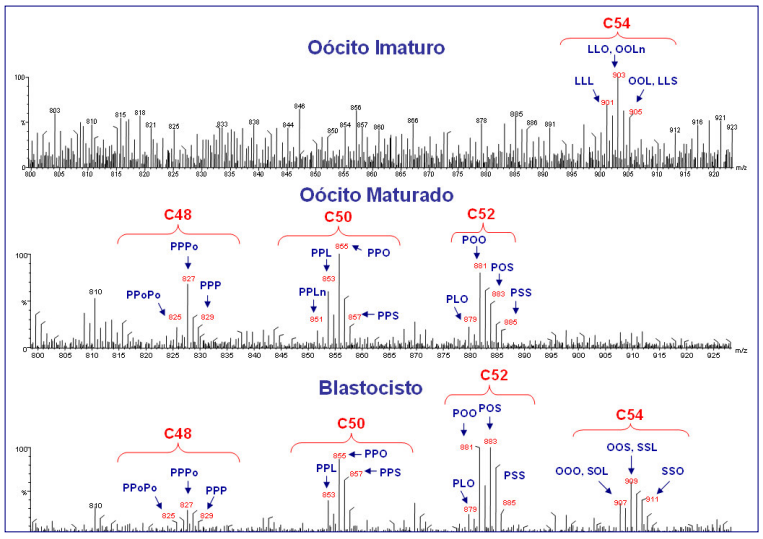
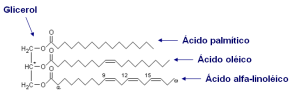


Figura 1. Espectros de massas indicando TAGs de um oócito imaturo, um oócito maturado e de um blastocisto. Os espectros foram obtidos por MALDI-TOF MS com matriz DHB.

Resultados

A matriz DHB mostrou-se apropriada para observar o perfil de triglicerídeos (TAGs) nas amostras, sendo possível verificar que os TAGs estão pouco presentes nos oócitos imaturos, mas aumentam em quantidade nos oócitos maturados e aparecem claramente nos embriões (Figura 1), sendo que os TAGs são detectados como adutos de sódio $[M+Na]^+$. Através da análise dos espectros de massas de alta resolução, foi possível identificar os TAGs presentes e a partir das massas moleculares, determinar a composição elementar e o número de carbonos/número de duplas ligações das três unidades de ácidos graxos (Tabela 1). Os TAGs descritos (Tabela 2) possuem em sua composição os ácidos graxos palmitoleico (16:1), palmítico (16:0), linolênico (18:3), linoleico (18:2), oleico (18:1) e esteárico (18:0). Os resultados mostraram que o uso de MALDI-TOF MS permitiu a obtenção de perfis lipídicos informativos para oócitos e embriões. Além disso, foi possível obter espectros individuais.



Exemplo de TAG

Tabela 1. valores de *m/z* dos TAGs observados em oócitos imaturos, oócitos maturados e embriões

TAG *m/z* $[M+Na^+]$	Oócito imaturo	Oócito maturado	Blastocisto
825		X	X
827		X	X
829		X	X
851		X	
853		X	X
855		X	X
857		X	X
879		X	X
881		X	X
883		X	X
885		X	X
901	X		
903	X		
905	X		
907			X
909			X
911			X

Tabela 2. Caracterização dos TAGs encontrados em oócitos e embriões

TAG *m/z* $[M+Na^+]$	Cadeias graxas	TAG*	NC/DL**
825	C16/C16:1/C16:1	PPoPo	48:2
827	C16/ C16/C16:1	PPPo	48:1
829	C16/ C16/ C16	PPP	48:0
851	C16/C16/C18:3, C16:1/C16/C18:2	PPLn, PoPL	50:3
853	C16/ C16/ C18:2	PPL	50:2
855	C16/C16/C18:1	PPO	50:1
857	C16/C16/C18	PPS	50:0
879	C16/ C18:2/ C18:1	PLO	52:3
881	C16/C18:1/C18:1	POO	52:2
883	C16/C18:1/C18	POS	52:1
885	C16/C18/C18	PSS	52:0
901	C18:2/C18:2/C18:2	LLL	54:6
903	C18:2/C18:2/C18:1, C18:1/C18:1/C18:3	LLO, OOLn	54:5
905	C18:1/C18:1/C18:2, C18:2/C18:2/C18	OOL, LLS	54:4
907	C18:1/C18:1/C18:1, C18/C18:1/C18:2	OOO, SOL	54:3
909	C18:1/C18:1/C18, C18/C18/C18:2	OOS, SSL	54:2
911	C18/C18/C18:1	SSO	54:1

* L: ácido linoléico, Ln: ácido linolênico, O: ácido oléico, S: ácido esteárico, P: ácido palmítico, Po: ácido palmitoléico

** número de carbonos/duplas ligações dos ácidos graxos graxos presentes no TAG.

Conclusão

Os resultados mostraram que o uso da técnica MALDI-TOF MS permitiu a obtenção de perfis lipídicos informativos para oócitos e embriões. Além disso, foi possível obter espectros individuais de oócitos e de embriões. O emprego dessa técnica para comparação do perfil lipídico de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* poderá trazer contribuições em estudos visando proporcionar suplementação de ácidos graxos apropriada com o objetivo de diminuir a criosensibilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*.