HUGO DE ROSSI

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA NA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* E CO-CULTIVADOS COM VESÍCULAS MULTILAMELARES

ASSIS

2019

HUGO DE ROSSI

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA NA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* E CO-CULTIVADOS COM VESÍCULAS MULTILAMELARES

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, para a obtenção do título de Mestre em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica)

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira (Departamento de Ciências Biológicas, FCL/Assis, UNESP).

Co-Orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Benites Aoki (Departamento de Biotecnologia, FCL/Assis, UNESP).

Co-Orientadora: Profa. Dra Gisele Zoccal Mingoti (Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, FMV/Araçatuba, UNESP).

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

ASSIS

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto Educacional de Assis – I E D A

De Rossi, Hugo

D32a Avaliação da composição lipídica na membrana citoplasmática de embriões bovinos produzidos *in vitro* e co-cultivados com vesículas multilamelares / Hugo De Rossi. Assis, 2019.

75 f.: il.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Assis – Universidade Estadual Paulista.
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira

1. Membrana plasmática. 2. Vesículas multilamelares. 3. Embriotoxicidade. 4. Criotolerância. I. Título.

CDD 636.08926

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Assis

Faculdade de Ciências e Letras
Seção Técnica de Pós-graduação
UNESP - Câmpus Assis

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA NA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* E CO-CULTIVADOS COM VESÍCULAS MULTILAMELARES

AUTOR: HUGO DE ROSSI

ORIENTADOR: MARCELO FÁBIO GOUVEIA NOGUEIRA

COORIENTADOR: PEDRO HENRIQUE BENITES AOKI

COORIENTADORA: GISELE ZOCCAL MINGOTI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOCIÊNCIAS, área: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARCELO FÁBIO GOUVEIA NOGUEIRA
Departamento de Ciências Biológicas / UNESP/Assis

Profa. Dra. SABRINA ALESSIO CAMACHO AOKI
UNESP/Assis / SP

Profa. Dra. PRISCILA CHEDIEK DALL'ACQUA
UNIFIMES / Mineiros/GO

Assis, 28 de junho de 2019

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me sustentar em todos os momentos e pelo Seu amor incondicional.

Aos orientadores, Prof. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira, Prof. Pedro Henrique Benitez Aoki e Profª Gisele Zoccal Mingoti, pela paciência em ensinar e orientar.

À Luana Teixeira Rodrigues-Rossi, companheira de laboratório, pela ajuda, companheirismo e paciência nos momentos difíceis.

Aos colegas do Laboratório de Micromanipulação Embrionária (LaMEm) pelo conhecimento adquirido.

Aos meus pais, Carlos Henrique e Sônia, que sempre acreditaram e lutaram para que eu pudesse realizar meus sonhos.

Á minha esposa Isabella que, nos momentos de fraqueza, foi minha força.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro (Código de financiamento 001).

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma colaboram para realização deste trabalho. Meu reconhecimento e gratidão.

DE ROSSI, Hugo. **Avaliação da composição lipídica na membrana citoplasmática de embriões bovinos produzidos *in vitro* e co-cultivados com vesículas multilamelares. 2019.** 75 f. Dissertação (Mestrado acadêmico em Biociências). – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, 2019.

RESUMO

Embriões bovinos produzidos *in vitro* são mais sensíveis à preservação de células e tecidos à baixas temperaturas do que aqueles produzidos *in vivo*. Vários estudos têm sido conduzidos na tentativa de melhorar esse ponto crítico, e dentro desse cenário, o conteúdo lipídico intracelular e a membrana plasmática têm sido apontados como fatores determinantes para o sucesso da criotolerância. Portanto, a modificação de um ou dos dois fatores, pode minimizar a sensibilidade embrionária à criopreservação, melhorando assim as taxas de sobrevivência para essa técnica. Neste contexto, as vesículas lipídicas se apresentam como uma excelente alternativa de reposição lipídica, pois proporcionam baixa toxicidade e conseguem ser absorvidas pela membrana plasmática *in vivo*. Porém, até o momento não há pesquisas que avaliem o uso das vesículas lipídicas durante a produção *in vitro* de embriões. Portanto, o objetivo dessa dissertação foi avaliar o perfil lipídico da membrana plasmática de embriões bovinos produzidos *in vitro* e co-cultivados com vesículas lipídicas do tipo multilamelares (MLV). Primeiramente foi avaliado a estabilidade das vesículas lipídicas em condições de cultivo *in vitro* de embriões, com atmosfera, temperatura e umidade controladas. Também foi avaliado a embriotoxicidade das vesículas co-cultivadas com embriões bovinos. Para a avaliação da estabilidade foram utilizados dois meios veículos na produção das vesículas: meio de cultivo embrionário e água ultrapura, em três concentrações de vesículas: 1,0 mmol/L; 1,5 mmol/L e 2,0 mmol/L, todas as concentrações foram submetidas à dois ambientes diferentes, sem incubação (4º C) e incubadas (5% CO_2 e 38,5º C) por dois períodos 24 e 48 horas. Para o teste de embriotoxicidade foram avaliados 5 grupos G1 (1,0 mmol/L), G2 (1,25 mmol/L), G3 (1,5 mmol/L), G4 (1,75 mmol/L) e G5 (2,0 mmol/L). O meio de cultivo *in vitro* contendo as vesículas lipídicas foi adicionado no D5, momento em que foi realizado o *feeding*. Os resultados obtidos pelas análises de DLS demonstraram que houve produção de vesículas utilizando meio de cultivo embrionário e que as vesículas são estáveis no ambiente de cultivo *in vitro* durante 24 e 48 horas. Produzindo vesículas de tamanho compatível com a zona pelúcida embrionária nos grupos meio

de cultivo embrionário 1,0 mmol/L incubado por 48 horas (454,35 nm) e, meio de cultivo embrionário 2,0 mmol/L incubadas por 24 horas (380,93 nm). No teste de embriotoxicidade não houve redução na taxa de desenvolvimento embrionário (P<0,05) nos grupos co-cultivados com vesículas lipídicas G1 (43,10%), G2 (44,33%), G3 (39,85%), G4 (33,00%) e G5 (38,14%) quando comparados ao grupo controle GC (47,31%). Em conclusão, as vesículas lipídicas não apresentaram toxicidade ou letalidade quando co-cultivadas com embriões bovinos e, o meio de cultivo embrionário e ambiente controlado (incubadora) não inibiu a produção de vesículas. Posteriormente, foi avaliado o perfil lipídico da membrana plasmática de embriões bovinos produzidos *in vitro* e co-cultivados com vesículas lipídicas do tipo multilamelares (MLV). Para isso foram testados 4 grupos, grupo controle (GC) sem vesículas, e os grupos tratamentos G1 (1,0 mmol/L), G3 (1,5 mmol/L) e G5 (2,0 mmol/L), com vesículas. Os embriões foram submetidos ao co-cultivo com as vesículas multilamelares no quinto dia de cultivo *in vitro* (D5), permanecendo incubados por 48h. Os íons obtidos através da análise Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI-MS) foram submetidos a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), onde foram selecionadas 6 espécies de lipídios de acordo com sua significância, comparando os grupos extremos (GC x G5), foi possível observar que os íons tiveram maior abundância no grupo tratado (G5) em relação ao grupo controle (GC). Os íons selecionados foram atribuídos aos fosfolipídios do tipo fosfatidilcolina, 720.6 (PCe 32:0), 754.9 (PC 32:1 ou PC 34:4), 759.0 (PC 34:2) e 781.2 (PC 34:2 ou 36:5) e glicerofosfolipídios, 779.1 (PG 42:4) e 797.3 (PG 44:5). Desses íons com maior abundância pós tratamento, dois já foram relacionados com o aumento da sobrevivência pós criopreservação (PC 32:1 ou PC 34:4 e PC 34:2). Em conclusão, o co-cultivo de embriões bovinos com vesículas lipídicas multilamelares aumentou a abundância do perfil lipídico da membrana plasmática dos embriões, o que pode aumentar a resistência dos embriões à criopreservação.

Palavras chave: membrana plasmática, embriotoxicidade, criotolerância.

DE ROSSI, Hugo. **Evaluation of lipid composition in the cytoplasmic membrane of bovine embryos produced *in vitro* and co-cultured with multilamellar vesicles. 2019.** 75 p. Dissertation (Master in Biosciences). –). São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Assis, 2019.

ABSTRACT

In vitro produced bovine embryos are more sensitive to the preservation of cells and tissues at low temperatures than those produced in vivo. Several studies have been conducted to improve this critical point, and within this scenario, intracellular lipid content and plasma membrane have been pointed as determining factors for the success of cryotolerance. Therefore, modification of one or both factors may minimize embryonic sensitivity to cryopreservation, thus improving survival rates for this technique. In this context, lipid vesicles are an excellent alternative for lipid replacement, as they provide low toxicity and can be absorbed by the plasma membrane in vivo. However, to date there is no research evaluating the use of lipid vesicles during in vitro embryo production. Therefore, the aim of this dissertation was to evaluate the lipid profile of the plasma membrane of bovine embryos produced in vitro and co-cultured with multilamellar lipid vesicles (MLV). Firstly, the stability of lipid vesicles was evaluated under in vitro culture conditions of embryos, with controlled atmosphere, temperature and humidity. The embryotoxicity of vesicles co-cultured with bovine embryos was also evaluated. For the stability evaluation, two vehicle media were used in the production of vesicles: embryonic culture medium and ultrapure water, in three vesicle concentrations: 1.0 mmol / L; 1.5 mmol / L and 2.0 mmol / L, all concentrations were subjected to two different environments without incubation (4° C) and incubated (5% CO_2 and 38.5° C) for two periods 24 and 48 hours. For the embryotoxicity test 5 groups G1 (1.0 mmol / L), G2 (1.25 mmol / L), G3 (1.5 mmol / L), G4 (1.75 mmol / L) and G5 were evaluated. (2.0 mmol / L). In vitro culture medium containing lipid vesicles was added at D5, at which time feeding was performed. The results obtained by DLS analysis demonstrated that vesicles were produced using embryonic culture medium and that the vesicles are stable in the in vitro culture environment for 24 and 48 hours. Producing vesicles of embryonic zona-compatible size in the 1.0 mmol / L embryonic culture medium incubated for 48 hours (454.35 nm) and 24 mmol / L embryonic culture medium incubated for 24 hours (380 .93 nm). In the embryotoxicity test there was no reduction in embryonic development rate (P

<0.05) in groups co-cultivated with lipid vesicles G1 (43.10%), G2 (44.33%), G3 (39.85%). , G4 (33.00%) and G5 (38.14%) when compared to the CG control group (47.31%). In conclusion, lipid vesicles showed no toxicity or lethality when co-cultured with bovine embryos and the embryonic culture medium and controlled environment (incubator) did not inhibit vesicle production. Subsequently, the plasma membrane lipid profile of bovine embryos produced in vitro and co-cultured with multilamellar lipid vesicles (MLV) was evaluated. Four groups were tested, control group (CG) without vesicles, and treatment groups G1 (1.0 mmol / L), G3 (1.5 mmol / L) and G5 (2.0 mmol / L), with vesicles. Embryos were co-cultured with multilamellar vesicles on the fifth day of in vitro culture (D5) and incubated for 48h. The ions obtained by Matrix-assisted laser desorption / ionization analysis (MALDI-MS) were submitted to partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), where 6 lipid species were selected according to their significance, comparing the extreme groups. (GC x G5), it was observed that the ions were more abundant in the treated group (G5) compared to the control group (CG). The selected ions were assigned to phosphatidylcholine-like phospholipids, 720.6 (PC 32: 0), 754.9 (PC 32: 1 or PC 34: 4), 759.0 (PC 34: 2), and 781.2 (PC 34: 2 or 36: 5) and glycerophospholipids, 779.1 (PG 42: 4) and 797.3 (PG 44: 5). Of these ions with greater abundance after treatment, two have been related to increased survival after cryopreservation (PC 32: 1 or PC 34: 4 and PC 34: 2). In conclusion, co-cultivation of bovine embryos with multilamellar lipid vesicles increased the abundance of the plasma membrane lipid profile of the embryos, which may increase embryo resistance to cryopreservation.

Keywords: plasma membrane, embryotoxicity, cryotolerance.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM - Atomic Force Microscopy

ATP – Trifosfato de Adenosina

BSA – Albumina sérica bovina

CAPES – Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior

CIV - Cultivo *in vitro*

CO_2 - Dióxido de carbono

CCOs - Complexos *cumulus* oócito

CPPS – Peptídeos de penetração celular

DGAT2 – *Diacilglicerol acyltransferase 2*

DH – Diâmetro hidrodinâmico

DPPC – 1,2 Dipalmitoil -sn- glycerol – 3 phosphocholine

DLS – *Dynamic light scattering*

ePC – fosfatidilcolina ligada a éter

ePE – fosfatidiletanolamina ligada a éter

EPM – Erro padrão médio

FIV - Fertilização *in vitro*

FSH – Hormônio folículo estimulante

GUV – Giant unilamellar vesicles

hCG – Gonadotrofina coriônica humana

IETS – *"International Embryo Transfer Society"*

LUV – *Large unilamellar vesicles*

MALDI-MS – *Matrix assisted laser desorption ionization/ mass spectrometry*

MIV - Maturação *in vitro*

MLV – *Multilamellar vesicles*

m/z – Massa/Carga

mSOF - *Modified synthetic oviduct fluid*

nm – Nanômetro

OPU – *Ovum pick up*

PC – Fosfatidilcolina

PCA – Análise dos componentes principais

PE – Fosfatidiletanolamina

PI – Fosfatidilinositol

PL – Fosfolipídios

PLS-DA – *Partial least squares-discriminant analysis*

PS - Fosfatidilserina

PIVE - Produção *in vitro* de embriões

RICM – *Reflection interference contrast microscopy*

SFB - Soro fetal bovino

SOFaa- “Synthetic Oviduct Fluid” suplementado com aminoácidos

SOV – Superovulação

SUV – *Small unilamellar vesicles*

SM - Esfingomielina

TALP-FIV – “Tyrode’s” albumina lactato piruvato

TE – Transferência de embriões

TCM-199 – “Tissue culture medium” 199

TG - Triacilgliceróis

µm – Micrômetro

% - Porcentagem

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO…… 13
2. REVISÃO DE LITERATURA..... 13
2.1 Produção *in vitro* de embriões..... 13
2.2 Lipídios 16
2.3 Vesículas Lipídicas..... 17
3. OBJETIVOS..... 19
3.1 Objetivo Geral..... 19
3.2 Objetivos Específicos..... 19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 20
Artigo 1. Estabilidade das vesículas multilamelares em meio e condições de cultivo *in vitro* de embriões e embriotoxicidade..... 25
1. INTRODUÇÃO 27
2. MATERIAL E MÉTODOS 29
2.1 Produção de vesículas multilamelares..... 29
2.2 Análise de estabilidade das vesículas multilamelares 30
2.3 Produção *in vitro* de embriões..... 30
2.3.1 Obtenção do complexo cumulus – oócito 30
2.3.2 Maturação *in vitro* 31
2.3.3 Fertilização *in vitro* 31
2.3.4 Desnudamento e cultivo *in vitro* 32
2.4 Avaliação da embriotoxicidade 32
2.5 Análise estatística 33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 33
3.1 Produção e estabilidade das vesículas multilamelares em meio e ambiente de cultivo *in vitro* 33
3.2 Embriotoxicidade 38
4. AGRADECIMENTOS 42
REFERÊNCIAS..... 42
Artigo 2. Perfil lipídico de embriões bovinos co-cultivados com vesículas multilamelares 45
1. INTRODUÇÃO 47
2. MATERIAIS E MÉTODOS 49

2.1 Produção de vesículas multilamelares 49
2.2 Produção *in vitro* de embriões 50
2.3 Análise dos lipídios de membrana por espectrometria de massas... 50
2.4 Análise estatística 51
3. RESULTADOS 52
4. DISCUSSÃO 59
5. AGRADECIMENTOS 61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 61
6. CONCLUSÃO GERAL 66
7. ANEXOS..... 67

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro é responsável por grande parte do PIB nacional e, nesta atividade, a pecuária desempenha um importante papel. Atualmente o Brasil conta com um rebanho de 219 milhões de cabeças de gado (MAPA, 2017), possuindo o segundo maior rebanho bovino do mundo, sendo 80% destinados a produção de carne. Mesmo com um grande rebanho, a produtividade do rebanho brasileiro está aquém do desejado. A produtividade do rebanho é medida pela eficiência reprodutiva, que está diretamente ligada à produção de crias saudáveis. Desse modo, animais geneticamente inferiores e com baixa fertilidade produtividade são descartados na busca do melhoramento genético do rebanho (BARUSELLI *et al*., 2006).

A crescente demanda por alimentos, dentre eles, a carne bovina, faz com que novas tecnologias sejam desenvolvidas para melhorar a produtividade do rebanho. Isso tem impulsionado o uso de biotecnologias reprodutivas avançadas, tais como clonagem, inseminação artificial, produção de embriões *in vivo* por superovulação (SOV), transferência de embrião e a produção *in vitro* de embriões (PIVE). Na busca pela melhora do atual cenário da produção animal, as biotecnologias da reprodução têm sido empregadas rotineiramente, principalmente em bovinos (BASSO *et al*., 2010).

Dentre elas, a PIVE, associada à punção folicular guiada por ultrassom (*Ovum Pick Up* – OPU), se destaca como um importante instrumento para a maximização do potencial do rebanho. Essa técnica possibilita a utilização de animais ainda jovens, a obtenção de um número maior de embriões por vaca, diminui o intervalo entre gerações e permite o acesso à animais geneticamente superiores (MERTON *et al*., 2013).

Segundo Viana (2018), em 2017 a produção mundial de embriões produzidos *in vitro* superou a produção de embriões derivados *in vivo* (992.289 e 495.054, respectivamente), e o Brasil se destaca como o segundo maior produtor mundial (345.528), perdendo apenas para o EUA (454.550).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produção *in vitro* de embriões

Desde a descoberta de Roberts Edwards (EDWARDS, 1965), a maturação *in vitro* de oócitos (MIV), a fertilização *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) de embriões

– técnica denominada, coletivamente, como PIVE - tem sido amplamente utilizadas para o estudo do desenvolvimento de oócitos e de embriões e, de modo mais aplicado, na reprodução assistida humana e em animais de produção (SUTTON-MCDOWALL e THOMPSON, 2015).

Na PIVE, o tipo de coleta interfere diretamente na morfologia e no desenvolvimento do complexo *cumulus-oócito* (CCO) (ANDRADE *et al*., 2012). A maturação é o processo biológico no qual ocorrem algumas mudanças no núcleo (quebra da vesícula germinativa, desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina) e no citoplasma do oócito (reorganização das organelas), além da reorganização do maquinário molecular, o que capacita o oócito para a fertilização (BLONDIN, 1995). Porém, quando o oócito é removido do ambiente folicular para a utilização na PIVE, o processo fisiológico de maturação é interrompido, induzindo a condensação da cromatina e a progressão espontânea da meiose, o que prejudica a síntese de transcritos e o acúmulo de moléculas que são necessárias para o desenvolvimento do oócito, além de alterar alguns dos componentes citoplasmáticos (SIRARD, 2000; FERREIRA *et al*., 2009).

Na fertilização, o oócito entra em contato com o espermatozoide gerando o zigoto que se desenvolve no blastocisto. Na produção *in vitro*, os espermatozoides precisam passar por um processo de seleção e de capacitação, que irá prepará-los para realizar a fertilização dos oócitos maturados (COELHO, *et al.*, 2000).

A capacitação é uma etapa em que ocorrem mudanças bioquímicas e morfológicas na membrana acrossômica e no movimento flagelar do espermatozoide. Na PIVE isso ocorre com a adição de agentes capacitantes, como a heparina ou o cálcio ionóforo, os quais fornecem um meio adequado ao espermatozoide para que ocorra a reação acrossômica e, consequentemente, a fertilização (YANG, 1993).

Na próxima etapa, o cultivo, ocorrem inúmeras divisões celulares primeiramente com redução no volume (clivagens) e depois com a manutenção do volume nas células filhas. Após a compactação entre as células, surge uma cavidade no interior delas (a blastocele) que marca o aparecimento do estágio de desenvolvimento denominado de blastocisto. De modo semelhante à maturação e à fertilização, o cultivo necessita de um ambiente controlado e favorável ao desenvolvimento embrionário (GONÇALVES *et al*., 2007).

Desse modo, a reprodução de mamíferos envolve uma sequência específica de interações entre espermatozoide, oócito e ambiente (ARTS *et al.,* 1993). O período que abrange as etapas finais da maturação do oócito até o desenvolvimento embrionário pré-implantação é altamente dinâmico, estando o CCO e o embrião expostos a vários microambientes diferentes (TERVIT *et al.*, 1972; MAAS *et al.*, 1976; FISCHER; BAVISTER,1993).

Apesar das pesquisas relacionadas às condições da PIVE que aumentem a eficácia na produção de blastocistos a partir de oócitos imaturos, a qualidade destes embriões tem ficado aquém daquela obtida em sistemas de produção *in vivo* de embriões (SUTTON-MCDOWALL; THOMPSON, 2015; RIZOS *et al*., 2002). De modo geral, na PIVE o desenvolvimento de oócitos bovinos até o estágio de blastocisto é limitado a cerca de 25 a 40% (RIZOS *et al*., 2002).

Uma das principais causas do baixo desenvolvimento embrionário na PIVE, quando comparado ao produzido *in vivo*, é a remoção do CCO do ambiente folicular. Essa remoção interfere na comunicação entre oócito e as células do *cumulus* (células somáticas), além de comprometer a ação de fatores que regulam a maturação nuclear e citoplasmática que estão presentes no fluido folicular (LONERGAN *et al.* 1994; COTICCHIO *et al.* 2004; KRISHER, 2004).

Por isso, embriões produzidos *in vitro* são mais sensíveis do que os produzidos *in vivo* e, dentro desse cenário, a criopreservação desses embriões se tornou um dos grandes desafios (SARAGUSTY, 2011; SUDANO, 2011).

A criopreservação leva a um estresse osmótico, injúria pelo frio e criofraturas, as quais ocasionam danos celulares, incluindo a membrana plasmática. Esse é um dos problemas que impedem o pleno sucesso da técnica de criopreservação (SEIDEL, 2006).

Portanto, o entendimento do metabolismo do CCO e do embrião, permite que sejam criados sistemas de cultivo melhorados, baseados nas condições ambientais encontradas *in vivo*, resultando em embriões produzidos *in vitro* mais viáveis e que tenham um maior potencial de desenvolvimento, de criopreservação e de estabelecer a gestação (SUTTON-MCDOWALL e THOMPSON, 2015).

Rizos e colaboradores (2002) afirmaram que o período de cultivo pós-fertilização é o período que tem o maior impacto na qualidade do blastocisto. Durante essa janela de seis a oito dias *in vitro*, ocorrem vários eventos importantes para o desenvolvimento do embrião (p. ex., a desmetilação dos genomas parentais, a perda

da totipotência, a blastulação e a expansão do embrião). Ainda nesses eventos, destacam-se: a primeira clivagem, cujo momento é conhecido por ser um indicador importante do potencial de desenvolvimento subsequente do embrião (LONERGAN *et al*., 1999); a ativação do genoma embrionário (MEMILI e FIRST, 2000); e o evento de compactação celular, que envolve o estabelecimento dos primeiros contatos íntimos celulares na formação da mórula e do blastocisto e que, além disso, propicia a diferenciação dos dois primeiros tipos celulares (o trofectoderme e a massa celular interna). Portanto, qualquer modificação nas condições do CIV, que afetem um ou vários desses processos pode ter um efeito importante na qualidade do blastocisto (RIZOS *et al.*, 2003).

2.2 Lipídios

Com a remoção do CCO do ambiente folicular, o conteúdo lipídico intracelular se torna uma importante fonte energética para a célula (DUNNING *et al*., 2014; STURMEY *et al*., 2009). Os lipídios são moléculas hidrofóbicas ou anfipáticas com diversos papéis biológicos (DUNNING *et al*., 2014). Com base no consumo de oxigênio, foi sugerido que os lipídios possam ser a única fonte de energia para suportar as exigências metabólicas no desenvolvimento embrionário durante as primeiras clivagens, destacando sua importância na maturação do oócito (DUNNING *et al*., 2014; STURMEY *et al*., 2009; MACKEEGAN, STURMEY, 2012; STURMEY *et al*., 2006; JUNGHEIM *et al*., 2011).

Os lipídios podem ser encontrados nos oócitos e em embriões na forma de triacilgliceróis (TG), que constituem a maior parte dos lipídios (FERGUSSON e LEESE, 1999). Os TG se encontram dentro de gotas lipídicas citoplasmáticas, são sintetizados pela ação da enzima diacilglicerol aciltransferase 2 (DGAT2) e ficam rodeados por proteínas denominadas *PAT proteins*.

O uso dos lipídios intracelulares como fonte de energia, na forma de trifosfato de adenosina (ATP), ocorre principalmente pela β-oxidação dos ácidos graxos nas mitocôndrias (CUMMINS, 2004). Esses ácidos graxos podem ser provenientes das gotas lipídicas, da biossíntese celular, ou até da membrana plasmática (RUDERMAN et al., 2003).

A membrana plasmática apresenta um papel fundamental nesse cenário. Segundo Becker e colaboradores (2009) as membranas celulares são muito mais que simples barreiras. Elas são uma parte essencial do funcionamento ativo das células

vivas, regulando a passagem de moléculas para o meio intra e extracelular, mantendo gradientes de concentração relevantes e realizando uma série de atividades metabólicas e biossintéticas, tais como aderência e sinalização. É considerado que, embora haja uma extraordinária diversidade de células e de organelas presentes nos seres vivos, a bicamada lipídica é a unidade estrutural básica das membranas biológicas. A membrana plasmática é composta por aproximadamente 50% de lipídios. Uma única membrana pode ter mais de 100 lipídios distintos, os três tipos mais abundantes são os fosfolipídios, os glicolipídios e os esteróis (DE ALMEIDA e LOURA, 2004).

Os fosfolipídios (PL) da membrana celular apresentam um papel chave nas características gerais do embrião, determinando várias propriedades físico-químicas tais como fluidez e permeabilidade (EDIDIN, 2003). Em vários estudos que tentaram melhorar a qualidade, a criotolerância e as propriedades de embriões produzidos *in vitro*, o conteúdo lipídico foi considerado crítico (SEIDEL, 2006). Os fosfolipídios são os lipídios mais abundantes nas membranas celulares eucarióticas (VAN MEER *et al*., 2008). A composição dos PL inclui diversas espécies moleculares de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilcolina ligada a éter (ePC) e fosfatidiletanolamina ligada a éter (ePE), mas apenas pequenas quantidades de fosfatidilserina (PS) ou esfingomielina (SM) (BARTZ *et al*., 2007).

2.3 Vesículas Lipídicas

Vesículas lipídicas são estruturas esféricas constituídas por um entorno de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas, podem apresentar diferentes tamanhos e organizações e são amplamente utilizadas como sistemas miméticos de membrana celular. Com a intenção de reproduzir as propriedades das membranas biológicas, as vesículas lipídicas podem ser constituídas de diferentes modelos, sendo cada um indicado para determinadas situações (LASIC, 1988). Esses modelos podem ter complexidades variadas, sendo constituídos por um único lipídio, ou então por misturas lipídica e, ainda, incluir ou não proteínas (CHENG *et al*., 2009).

O mecanismo de formação das vesículas ainda não está completamente elucidado. Entretanto, tem sido observado que a hidratação de filmes fosfolipídicos ou a simples solubilização dos fosfolipídios em água, permite a formação espontânea de vesículas multilamelares, como é observado na Figura 1 (LASIC, 1988). A maioria dos

lipídios com duas caudas hidrofóbicas se associam espontaneamente em água formando vesículas multilamelares (*Multilamellar Vesicles*; MLVs). Por outro lado, vesículas unilamelares são predominantemente formadas sob a ação de uma energia externa, podendo ser classificadas de acordo com o tamanho (AOKI, 2014). As vesículas multilamelares são aquelas formadas por mais de uma bicamada fosfolipídica com diâmetro entre 0,5 µm a 10 *µ*m. Já as vesículas unilamelares são formadas por uma única bicamada lipídica e podem ter diâmetro variados:

Vesículas Unilamelares Pequenas (*Small Unilamellar Vesicles* - SUV) ou lipossomos - de 20 nm a 100 nm;

Vesículas Unilamelares Grandes (*Large Unilamellar Vesicles* - LUV) - 100 nm a 500 nm;

Vesículas Unilamelares Gigantes (*Giant Unilamellar Vesicles* - GUV) - 500 nm a 10 *µ*m.

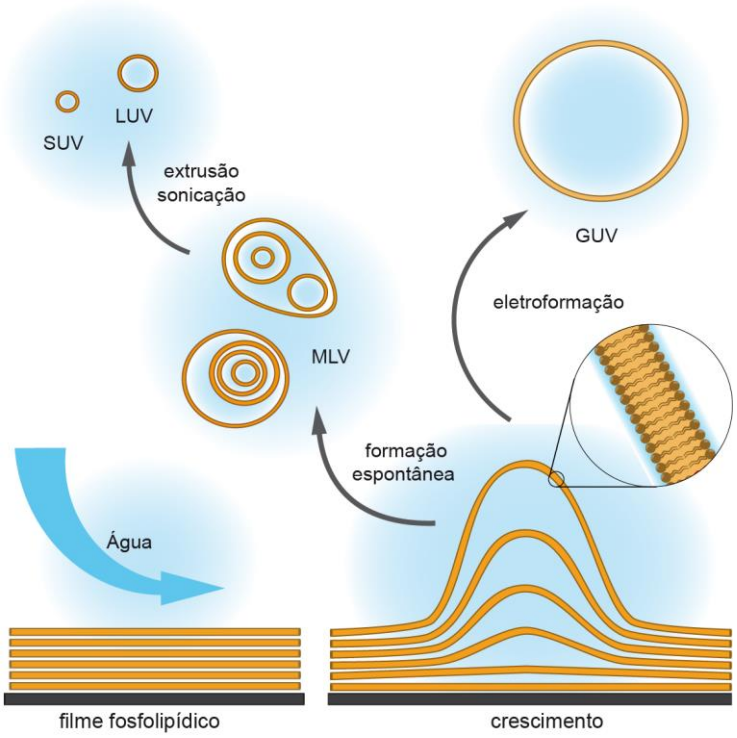


Figura 1. Representação esquemática dos mecanismos de formação de vesículas lipídicas. MLV (multilamellar vesicles), LUV (large unilamellar vesicles), SUV (small unilamellar vesicles) GUV (giant unilamellar vesicles). *Adaptado* de LASIC (1988).

As MLVs têm sido úteis como modelos para o estudo das membranas celulares (bicamadas fosfolipídicas) e como vetores para a entrega de fármacos para a célula-alvo (GARRETT *et al*., 1999). Nessa função, as MLVs têm baixa toxicidade quando

usadas *in vivo* (VAAGE *et al*., 1995; HARA *et al*., 1995) ou *in vitro* (BOELAERT, 1994). Assim, as MLVs, são um veículo desejável para a entrega de agentes citoativos e, em alguns casos, são mais eficazes do que a co-incubação com uma alta concentração do fármaco livre (JONES *et al*., 1994).

Desse modo, as MLVs têm sido o tema de vários artigos de revisão, sendo amplamente usadas na medicina (BANERJEE, 2001) como vetor para o transporte intracelular (VAAGE *et al*., 1995; WANG e TOY, 2002; CULLIS e FENSKE, 1998) e na interação celular (MARGOLIS, 1984; MACDONALD, 1990; MONCK; FERNANDEZ, 1996). Como as vesículas apresentam elevado potencial para o transporte de variadas moléculas bioativas, elas poderiam ser utilizadas em aplicações terapêuticas em humanos e animais (SAMAD *et* al., 2007). Entretanto, pesquisas que associem a reprodução animal, principalmente a PIVE, e o uso de vesículas lipídicas ainda não foram realizadas de modo consistente.

Desse modo, o presente trabalho pretende avaliar a utilização de MLVs como fator de entrega e/ou induzir a alterações dos lipídios da membrana plasmática de blastocistos. Essa interação, entre as MLVs e os lipídios da membrana plasmática, poderia levar a uma modificação no perfil lipídico da membrana celular de tal modo que, potenciais mudanças na criotolerância e no metabolismo energético de lipídios poderiam ser obtidos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o uso das MLVs no co-cultivo com embriões bovinos como potencial veículo de entrega de lipídios para a membrana plasmática do embrião.

3.2 Objetivos específicos

i) caracterizar a estabilidade das vesículas multilamelares nas condições de cultivo;

ii) determinar a maior concentração não embriotóxica das vesículas multilamelares;

iii) determinar, por meio da espectrometria de massas (MALDI-MS), o perfil lipídico da membrana de blastocistos controle e de blastocistos tratados com vesículas multilamelares durante o cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTS, E. G. J. M.; KUIKEN, J.; JAGER, S.; HOEKSTRA, D. Fusion of artificial membranes with mammalian spermatozoa. **Eur. J. Biochem**. 217*,* 1001-1009, 1993.

AOKI, P. H. B. *Sistemas Bioinspirados Aplicados no Estudo de Interação e Sensoriamento de Derivados Xantênicos*. 2014. 127f. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho" – UNESP, Presidente Prudente, 2014.

ANDRADE, G.A., FERNANDES, M.A., KNYCHALA, R.M., PEREIRA JÚNIOR, M.V., OLIVEIRA, A.J., NUNES, D.P, BONATO, G.L., SANTOS, R.M. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro**. Rev Bras Reprod Anim**, v.36, p.66-69, 2012.

BANERJEE, R. Liposomes: applications in medicine. **J Biomater Appl.**,16, 3-21, 2001.

BARUSELLI, P. S., AYRES, H., SOUZA, A.H., MARTINS, C.M., GIMENES, L.U., TORRES-JUNIOR, J.R.S. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2., Londrina, 2006. Anais eletrônicos. Disponível em: http://www.cemtralbelavista.com.br/adm/Filemanager/ckeditor/arquivos/Baruselli_e_col._IATF.pdf. Acesso em: 18 set. 2018.

BASSO, A.C.; SCHNEIDER, C.L.; PONTES, J.H.F. Novas alternativas para a aplicação em larga escala de embriões produzidos in vitro. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 4, 2004, Londrina, PR. Anais… São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnica, Universidade de São Paulo, p. 205- 209, 2010.

BARTZ, R.; LI, W. H.; VENABLES, B.; ZEHMER, J. K.; ROTH, M. R.; WELTI, R.; ANDERSON, R. G.; LIU, P.; CHAPMAN, K. D. Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. **J Lipid Res.**, 48, p837-847, 2007.

BECKER, W. M.; KLEINSMITH, L. J.; HARDIN, J.; BEROTNI, G. P. The World of the Cell, **Pearson Benjamin Cummings**, San Francisco, 2009.

BOELAERT, J. R. Mucormycosis (zygomycosis): is there news for the clinician? **J. Infect**. 28, 1-6, 1994.

BLONDIN, P., SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Mol Reprod Devel**, v.41, p.54-62, 1995.

CULLIS, P. R.; FENSKE, D. B. Model membrane systems as drug delivery vehicles. **Biologiske Skrifter**., 49, 201, 1998.

COTICCHIO, G., SERENI, E., SERRAO, L., MAZZONE, S., IADAROLA, I., AND BORINI, A. What criteria for the definition of oocyte quality? *Ann N Y* ***Acad Sci*** 1034, 132-44, 2004.

COELHO, L.A., ESPER, C.R., GARCIA, J.M. Fecundação in vitro de ovócitos bovinos com sêmen submetido a diferentes diluidores. **Rev Bras Zootec**, v.29, p.397-402, 2000.

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

CHENG, H. T., LONDON, M., LONDON, E. Preparation and Properties of Asymmetric Vesicles That Mimic Cell Membranes. Effect upon Lipid Raft Formation and Transmembrane Helix Orientation. **J. Biol. Chem**. 284, 6079-92, 2009

DE ALMEIDA, R.F.M. e LOURA, L.M.S. Tópicos de Biofísica de Membranas. LIDEL, Lisboa, 2004.

DUNNING, K. R.; RUSSEL, D. L.; ROBKER, R. L. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and b-oxidation. **Reproduction**, 148, 15–27, 2014.

EDIDIN, M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. **Nature**, 4, 414-418, 2003.

EDWARDS, R. G. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. **Nature**, 208, 349-351, 1965.

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

FERREIRA E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. A. S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modification and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, p. 836-848, 2009.

FISCHER, B.; BAVISTER, B. D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. **J Reprod Fertil**, 99, 673-679, 1993.

GARRETT, F. E.; GOEL, S.; YASUL, J.; KOCH, R. A. Liposomes fuse with sperm cells and induce activation by delivery of impermeant agents. **Biochimica et Biophysica Acta,** 1417, 77-88, 1999.

GONÇALVES, P.B.D., BARRETA, M.B., SANDRI, L.R., FERREIRA, R., ANTONIAZZI, A.Q. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Rev Bras Reprod Anim**, v.31, p.212-217, 2007.

HARA, T.; ARAMAKI, Y.; TAKDA, S.; KOIKE, K.; TSUCHIYA, S. **Gene**, 159, 167-174, 1995.

JONES, M. N.; KASZUBA, M.; ROEBOEIRAS, M. D.; LYLE, I. G.; HILL, K. J.; SONG, Y. H.; WILMOT, S.W.; CREETH, J. E. The targeting of phospholipid liposomes to bacteria. **Biochim. Biophys. Acta**, 1196, 57-64, 1994.

JUNGHEIM, E. S.; LOUDEN, E. D.; CHI, M. M.; FROLOVA, A.; RILEY, J. K.; MOLEY, K. H. Preimplantation exposure of mouse embryos to palmitic acid results in fetal

growth restriction followed by catch-up growth in the offspring. **Biology of Reproduction**, 85, 678–683, 2011.

KRISHER, R.L. The effect of oocyte quality on development. ***J Anim Sci*** 82 E-Suppl, E14-23, 2004

LASIC, D. D. ***Biochemical Journal***, 256, 1-11, 1988.

LIM, J.M., REGGIO, B.C., GODKE, R.A., HANSEL, W. Development of in vitro derived bovine embryos cultured in 5% CO2 in air or in 5% O2, 5% CO2 and 90% N2. **Hum Reprod**, v.14, p.458-464, 1999.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; PIUMI, F.; RIEGER, D.; HUMBLOT, P.; BOLAND, M. P. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex and pregnancy rates following transfer of bovine preimplantation embryos. **J Reprod Fertil**, 117, 159–167, 1999.

LONERGAN, P., MONAGHAN, P., RIZOS, D., BOLAND, M.P., AND GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. ***Mol Reprod Dev*** 37(1), 48-53, 1994.

MAAS, D. H.; STOREY, B. T.; MASTROIANNI, L. Jr. Oxygen tension in the oviduct of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Fertil Steril**, 27,1312-1317, 1976.

MACDONALD, R. C. Surface chemistry of phospholipid vesicles relevant to their aggregation and fusion. **Hepatology**, 12, 56–60, 1990.

MACKEEGAN, P. J.; STURMEY, R. G. The role of fatty acids in oocyte and early embryo development. **Reprod, Ferti and Develop**, 24, 59–67, 2012.

MARGOLIS, L. B. Cell Interactions with model membranes. Probing, modification and simulation off cell surface functions. **Biochim. Biophys. Acta**, 779, 161, 1984.

MEMILI, E.; FIRST, N. L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. **Zygote**, 8, 87–96, 2000.

MERTON J.S.; KNIJN H.M.; FLAPPER H.; DOTINGA F.; ROELEN B.A.J.; VOS P.L.A.M.; MULLAART E. Cysteamine supplementation during in vitro maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. **Theriogenology**, v. 80, p. 365-371, 2013.

MONCK, J. R.; FERNANDEZ, J. M. The fusion pore and mechanisms of biological membrane fusion. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, 8, 524–533, 1996.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol Reprod Dev**, 61**,** 234–248, 2002.

RIZOS, D.; GUTIERREZ, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression. **Biology of Reproduction**, 68, 236–243, 2003

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

SAMAD, A., SULTANA, Y., AQIL, M. Lipossomal drug delivery sistems: an update review. **Current Drug Delivery**, New Delhi, v. 4, n. 4, 297-305, 2007.

SARAGUSTY, J., ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**,141:1–19, 2011.

SEIDEL, G. E. Jr. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenol**, 65, 228, 2006.

SIRARD, M-A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1241-1254, 2000.

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

SUTTON-MCDOWALL, M. L.; THOMPSON, J. G. Metabolism in the pre-implantation oocyte and embryo. **Anim. Reprod.** v.12, n.3, 408 – 417, Jul./Set. 2015.

STURMEY, R. G.; REIS, A.; LEESE, H. J.; MCEVOY, T. G. Role of Fatty Acids in Energy Provision During Oocyte Maturation and Early Embryo Development. **Reprod Dom Anim**, York, 44 (Suppl. 3), 50–58, 2009.

STURMEY, R. G.; O´TOOLE, P. J.; LEESE, H. J. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial: lipid association in the porcine oocyte. **Reproduction,** 132, 829–837, 2006.

TERVIT, H. R.; WHITTINGHAM, D. G.; ROWSON, L. E. Successful culture in vitro of sheep and cattle ovarian oocytes. **J Reprod Fertil**, 30**,** 493-497, 1972.

VAAGE, J.; DONOVAN, D.; LOFTUS, T.; USTER, P.; WORKING, P. **Eur. J. Cancer**, 31A, 367-372, 1995.

VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 9, p112–124, 2008.

VIANA, J.H.M. 2017 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Is it a turning point? In 2017 more in vitro-produced than in vivo-derived embryos were transferred worldwide. **Embryo Transfer Newsl**, v.36(4), p.8-25, 2018.

WANG, H. S.; TOY, P. C. **Biochim. Biophys. Acta**, 15, 25, 2002.

YANG, X., JIANG, S., FOOTE, R.H. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. **Mol Reprod Devel,** v.34, p.94-100, 1993.

ARTIGO 1

Avaliação da estabilidade e da toxicidade de vesículas lipídicas multilamelares em meio e em condições de cultivo *in vitro* de embriões bovinos

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico “Reproductive Biology” (fator de impacto 1.446).

Avaliação da estabilidade e da toxicidade de vesículas lipídicas multilamelares em meio e em condições de cultivo *in vitro* de embriões bovinos

Hugo De Rossi [a], Luana Teixeira Rodrigues-Rossi [bc], Monique Lemos [e], Eloi da Silva Feitosa [e], Gisele Zoccal Mingoti [bc], Pedro Henrique Benites Aoki [d] Marcelo Fábio Gouveia Nogueira [a]

[a] Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Micromanipulação Embrionária, Av. Dom Antônio 2100, Assis, São Paulo, Brasil.

[b] Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Medicina Preventiva e Reprodução Animal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castelane - S/N - Vila Industrial, Jaboticabal, São Paulo, Brasil

[c] Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária, Laboratório de Fisiologia da Reprodução, Rua Clóvis Pestana 793, Araçatuba, São Paulo, Brasil

[d] Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Departamento de Biotecnologia, Av. Dom Antônio 2100, Assis, São Paulo, Brasil.

[e] Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, Departamento de Física, Rua Cristóvão Colombo 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

Autor correspondente: Tel: +55 18 3302 5848 Ramal: 5792. E-mail: marcelo@assis.unesp.br (M.F.G. Nogueira)

ORCID

Gisele Zoccal Mingoti: ID https://orcid.org/0000-0002-3059-4458 28

Pedro Henrique Benites Aoki: ID https://orcid.org/0000-0003-4701-6408 29

Marcelo Fábio Gouveia Nogueira: ID https://orcid.org/0000-0002-2239-9652

1. INTRODUÇÃO

A entrega intracelular, até hoje, é um desafio. A célula apresenta mecanismos que permitem que nutrientes sejam captados do meio exterior para o meio intracelular, um destes mecanismos é denominado endocitose. Isso é possível graças aos endossomos, que são pequenas vesículas de transporte, derivadas da membrana plasmática que possibilitam a internalização de nutrientes ou fármacos (CONNER; SCHMID, 2003). Porém, esse mecanismo de captação - de nutrientes ou drogas, do meio extracelular para o meio intracelular - pode degradar as substâncias, anulando ou diminuindo seu efeito. Por isso, é desejável o desenvolvimento de novos métodos para driblar a degradação que ocorre durante a endocitose (SHAREI *et al*., 2013; WITTRUP *et al*., 2015).

Pesquisas têm sido realizadas nesse sentido (VASIR; LABHASETWAR, 2007), tais como, os peptídeos de penetração celular (CPPs) (KARAGIANNIS *et al.*, 2013), os vetores virais (NAYAK e HERZOG, 2010) e métodos físicos (WELLS, 2004; BOUKANY *et al*., 2011) que apesar de terem surgido nos últimos anos, ainda apresentam limitações.

Neste contexto, Pagano e Weinstein (1978) sugerem que as vesículas lipídicas são um sistema alternativo viável e biocompatível que serve de vetor de transporte e que pode se fusionar com a membrana celular.

As vesículas lipídicas são estruturas esféricas formadas por uma bicamada lipídica, podendo apresentar vários tamanhos e organizações. Podem ser constituídas por um único lipídio ou por uma mistura lipídica, e isolam os compartimentos internos do meio externo (FRÉZARD *et al*., 2005). Apresentam uma fase externa, constituída de membranas fosfolipídicas e uma fase interna de meio aquoso, sendo possível adicionar várias moléculas, meios ou drogas nesse espaço (FRÉZARD, 1999). Isso faz com que esse sistema seja o mais utilizado para mimetizar as membranas biológicas (CHENG *et al*., 2009). As vesículas lipídicas são geralmente formadas a partir do glicerofosfolipídio fosfatidilcolina mas podem ser obtidos através de qualquer substância anfifílica que forme fase lamelar. São sistemas que permitem várias modificações quanto ao tamanho, lamelaridade, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno. Lipídios com carga efetiva negativa ou positiva podem ser incluídos na bicamada fosfolipídica lipossomal, influenciando na incorporação de substâncias, impedindo a agregação e/ou fusão de vesículas e

modulando seu destino no organismo (FRÉZARD *et al*., 2005; CARMONA-RIBEIRO, 2000).

A preparação de vesículas pode ser por agitação, sonicação, extrusão, entre outros. Dependendo do método utilizado, se obtém formas vesiculares distintas, com diâmetros entre 20 nm a 10 µm. As vesículas de maior simplicidade experimental em termos de preparação são as multilamelares, visto que a maior parte dos lipídios com duas caudas hidrofóbicas se associam naturalmente, formando esse tipo de vesícula em presença de água. A partir destas, são obtidos os demais tipos de vesículas, as vesículas unilamelares pequenas ou SUV (diâmetro de 20 a 100 nm) e as vesículas unilamelares grandes ou LUV (diâmetro de 100 a 500 nm), que são obtidas através de extrusão ou sonicação das MLV. Já as vesículas unilamelares gigantes ou GUV (diâmetro de 500 nm a 10 *µ*m) são obtidas através de eletroformação (LASIC, 1988).

Para a obtenção dessas vesículas, primeiramente os compostos lipídicos são dissolvidos em solvente adequado, como o clorofórmio. Após a evaporação do solvente, obtém-se um filme lipídico fino, então, este é hidratado com uma solução, em temperatura acima da temperatura de transição de fase do lipídio. Após a hidratação do lipídio, a solução passa por ciclos de agitação e aquecimento, até a obtenção de uma solução de MLV. Desta solução é obtido os outros tipos de vesículas, seja por sonicação (SUV) ou extrusão (LUV). As SUV e LUV tem diâmetro muito pequenos para serem observadas por meios ópticos, por isso as técnicas mais indicadas para observar sua caracterização são por raio-x, dispersão de nêutrons, microscopia de força atômica (AFM) e espalhamento dinâmico de luz (DLS). Já as GUV, por apresentarem maior diâmetro, podem ser observadas em meios ópticos como a microscopia de contraste de fase, fluorescência e RICM (*Reflection Interference Contrast Microscopy*) e confocal (AOKI, 2014).

Por serem produzidas a partir de substâncias encontradas nas membranas celulares, as vesículas lipídicas têm sua aceitação facilitada, porém, a utilização dessa ferramenta durante o desenvolvimento embrionário ainda permanece desconhecida. A adição de substâncias exógenas durante o desenvolvimento embrionário pode ser considerada perigosa, podendo levar a alterações fetais e embrionárias de natureza morfológica ou fisiológica e, até a morte embrionária (RAMOS *et al.*, 2008, RAZZA *et al*., 2012).

Assim, para que haja taxas satisfatórias no desenvolvimento embrionário é essencial que se forneça as condições favoráveis aos embriões, que normalmente são encontradas no ambiente materno *in vivo*, onde o oócito é fertilizado e se desenvolve até o estágio de embrião (LIMA e SOUZA, 2009). Nesse sentido, pesquisas têm sido realizadas para que se possa estabelecer condições que possibilitem o desenvolvimento embrionário normal, mas também, estabelecer limites ou então restrições ao uso de substâncias e medicamentos (RAZZA *et al*., 2012) que possam interferir no desenvolvimento ou morte embrionária.

A utilização de vesículas lipídicas, com o intuito de modificar o perfil lipídico da membrana plasmática de embriões produzidos *in vitro*, ainda é desconhecida, sendo um campo de pesquisa promissor. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar se as vesículas lipídicas, do tipo multilamelares, são estáveis em meio de cultivo embrionário e no ambiente controlado (incubadora) do cultivo *in vitro*. Além disso, para que possam ter alguma utilização prática no cultivo *in vitro*, foi avaliada a sua letalidade ou a sua toxicidade potencial para os embriões.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Produção de vesículas multilamelares

Para a produção de MLVs, o fosfolipídio 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em clorofórmio, em um tubo de ensaio de fundo redondo e seco, com um fluxo de nitrogênio para formar uma película fina na parede do tubo. A amostra foi deixada em um dissecador a vácuo por 3 horas, para remover solventes residuais. A película foi então ressuspendida em dois meios diferentes, água ultra-pura (Mili-Q) e meio de cultivo embrionário (CIV) SOFaaci (Synthetic Oviduct Fluid), acrescido de soro fetal bovino (2,5% v/v), BSA (5 mg/mL) e piruvato (13 mM).

Foram utilizadas três concentrações de MLVs diferentes para cada meio citado anteriormente, 1,0 mmol/L, 1,5 mmol/L e 2,0 mmol/L. Todos grupos foram submetidos a dois períodos de incubação (24 e 48 horas), em incubadora com atmosfera gasosa controlada (5% CO_2 em ar) e temperatura de 38,5ºC (Figura 1). As MLVs são normalmente armazenadas em ambiente refrigerado (4ºC) e, por esse motivo, no presente trabalho ele foi considerado como sendo aquele sem incubação, onde os meios e as concentrações foram armazenadas em refrigerador com temperatura

controlada (4ºC), igualmente por dois períodos, 24 e 48 horas. Os tempos de incubação foram escolhidos pois representam os dias de cultivo desde mórulas (D5) até blastocistos (D7), o que coincidiria com o momento de *feeding* dos embriões.

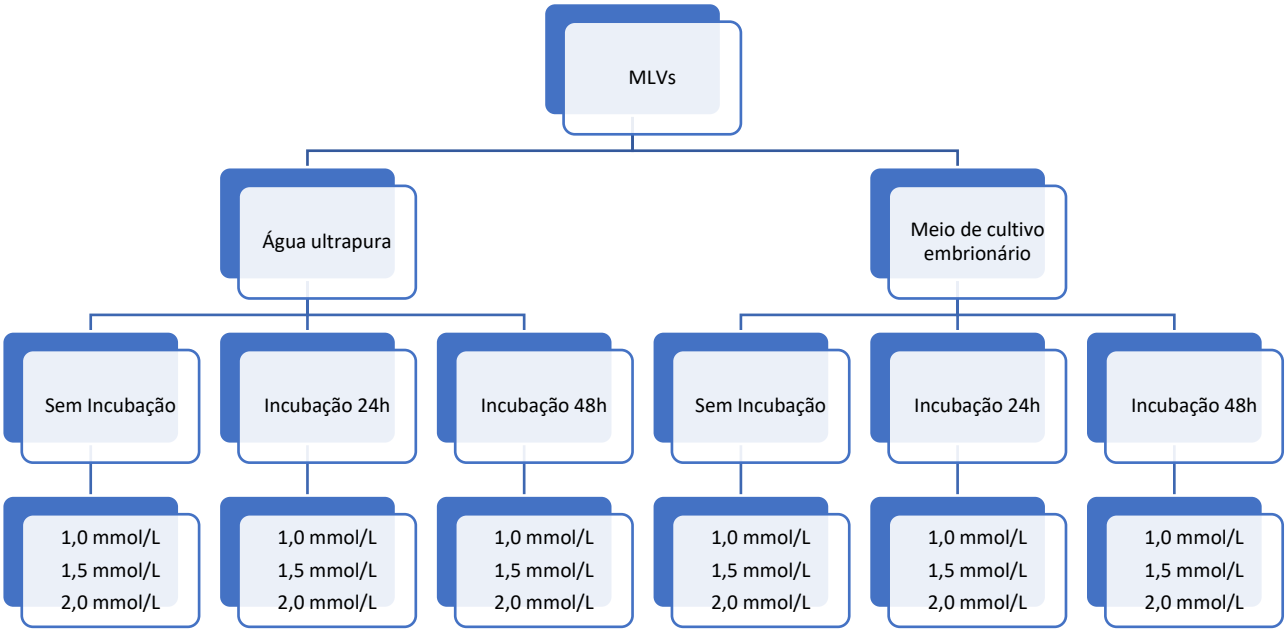


Figura 1. Esquema ilustrativo do delineamento dos grupos experimentais.

2.2. Análise de estabilidade das vesículas multilamelares

A estabilidade das vesículas (diâmetro hidrodinâmico – DH) em condições de cultivo *in vitro* foi avaliada pela técnica de dissipação dinâmico de luz – DLS (*Dynamic Light Scattering*) (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, EUA), equipado com laser He-Ne (comprimento de onda 633nm) operando com uma potência máxima ajustável de 15 mW (STETEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016).

2.3. Produção *in vitro* de embriões

2.3.1. Obtenção do complexo *cumulus*-oócito

Os ovários, predominantemente de fêmeas *Bos indicus*, foram obtidos em abatedouro e transportados até o laboratório em recipiente térmico contendo solução salina estéril aquecida a 30°C. No laboratório, foram lavados em álcool 70% e solução salina. Os folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm foram aspirados com auxílio de seringa de 10 mL acoplada a agulha calibre 18G. O fluido folicular recuperado foi

depositado em tubo de fundo cônico e então colocado em repouso no banho seco a 37,5°C para a formação do *pellet* de células. O *pellet* recuperado foi colocado juntamente com líquido folicular centrifugado em placa de Petri (90mm) para localização e seleção dos CCOs de grau 1 e 2 de acordo com Stojkovic *et al.* (2001), ou seja, que apresentassem citoplasma homogêneo e granulações finas, ou com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares e múltiplas camadas compactas de células do cumulus foram selecionados para o experimento.

2.3.2. Maturação *in vitro*

Os CCOs selecionados foram então transferidos para placas de 4 poços (NUNC, Nunclon Delta Tratado 4-Well IVF Dish, Dinamarca) contendo 500 µL de meio MIV (25 a 30 estruturas por poço), sem óleo mineral. O cultivo foi realizado durante 22 horas a 38,5ºC em atmosfera de 5% de CO_2 em ar com umidade máxima.

O meio de MIV utilizado foi o TCM-199 suplementado com 0,2 mM de piruvato, 25 mM bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de amicacina, 0,5 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH; Folltropin-V; Bioniche Animal Health, Ontario, Canada), 100 UI/mL de gonadotrofina coriônica humana (hCG; Vetecor; Hertape Calier, Juatuba, MG, Brazil) e 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA).

2.3.3. Fertilização *in vitro*

Os CCOs maturados foram retirados do meio MIV e transferidos para 100 µL de meio de fertilização, composto por Tyrode-Albumina-Lactato-Piruvato (TALP) contendo 0,2 mM de piruvato, 25 mM bicarbonato de sódio, 13 mM de lactato de sódio, 50 µg/mL de amicacina, 6 mg/mL albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos, 10 µg/mL de heparina, 20 µM de penicilamina, 10 µM hipotaurina e 2 µM epinefrina (meio TALP-FIV).

Para a inseminação foram utilizadas palhetas de sêmen criopreservado de um único touro da raça Nelore. As palhetas foram descongeladas à 37ºC por 30 segundos e o conteúdo foi submetido à centrifugação em gradiente de densidade descontínua de Percoll (45% e 90%; GE Healthcare, Uppsala, Suécia) durante 7 minutos a 2500 x g, em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 500 µL de meio TALP, sendo novamente centrifugado por 5 minutos a 5000 x g. Os espermatozoides ($2x10^6$ células/mL) foram adicionados à gota de fertilização contendo 100 µL do meio de fertilização TALP-FIV. Os CCOs e

os espermatozoides foram co-incubados por 18 horas a 38,5°C e 5% de CO_2 em ar e umidade máxima. O início da FIV foi definido como o dia 0 (D0).

2.3.4. Desnudamento e Cultivo *in vitro*

O meio para cultivo dos embriões utilizado foi o "*Synthetic Oviduct Fluid"* modificado (mSOF), suplementado com 0,2 mM de L-glutamina, 0,34 mM citrato de sódio, 2,8 Mm de myo-inositol, 2% aminoácidos essenciais, 1% aminoácidos não essenciais, 0,2 mM piruvato, 50 µg/mL de amicacina, 5 mg/mL de BSA fração V e 2,5% de SFB.

De 18 a 20 horas após a inseminação, os prováveis zigotos foram submetidos ao processo de desnudamento, cuja finalidade é a remoção das células do cumulus que circundam os prováveis zigotos. Para isso, suaves pipetagens repetidas dos mesmos causaram um turbilhão no meio de fertilização o que resultaram no desprendimento das células do cumulus.

Os prováveis zigotos foram transferidos para 500 µL de meio mSOF sem óleo mineral (25 a 30 estruturas por poço) e cultivados a 38,5ºC em 5% de CO_2 em ar, com máxima umidade por até 7 dias. A taxa de clivagem foi avaliada 72 h após a inseminação (D3). No quinto dia de cultivo (D5) foi realizado o *feeding*. Nesse momento, foi avaliada a taxa de produção de mórulas (≥32 células). No último dia de cultivo (D7), os embriões foram submetidos novamente a análise para verificar a taxa de produção total de blastocistos e amostras de blastocistos (grau 1 de qualidade segundo classificação IETS) foram coletadas dos grupos experimentais.

2.4. Avaliação da embriotoxicidade

Os embriões descritos anteriormente foram cultivados na ausência (grupo controle; GC) ou presença de MLVs, adicionadas durante o *feeding* (D5). Foram testadas cinco concentrações de MLVs, 1,0 mmol/L (G1); 1,25 mmol/L (G2); 1,5 mmol/L (G3); 1,75 mmol/L (G4) e 2,0 mmol/L (G5).

A avaliação da embriotoxicidade foi mediante a comparação da taxa de blastocistos obtidos nos cinco grupos tratados (G1, G2, G3, G4 e G5) com aquela do grupo controle. Foi considerada letal a concentração que impediu a produção de blastocistos e embriotóxica aquela que reduziu significativamente a taxa de blastocistos em relação ao controle (RAZZA *et al.*, 2012).

2.5. Análise estatística

Para a análise de embriotoxicidade, os dados foram analisados por ANOVA utilizando o software estatístico JMP® versão 5.0.1a (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Cada experimento foi realizado em oito replicatas e, em cada replicata, cada grupo apresentou entre 40 e 80 CCOs. A mesma partida de soro fetal bovino foi utilizada em todos os grupos experimentais, a fim de evitar variações na composição lipídica de membrana decorrentes dessa fonte. Diferenças com probabilidades (P) menores que 0,05 (P<0,05) foram consideradas significativas. Os valores estão apresentados como média e erro padrão da média (EPM).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Produção e estabilidade das vesículas multilamelares em meio e ambiente de cultivo *in vitro*

O diâmetro médio (nm) e erro padrão médio (EPM) das vesículas produzidas em água ultrapura e em meio de cultivo embrionário, nas três concentrações (1,0; 1,5 e 2,0 mmol/L) e nas três formas de armazenamento (refrigerador e incubação por 24 ou 48 horas, estão descritos na Tabela 1.

Os resultados de DLS mostraram que houve produção de vesículas multilamelares em meio de cultivo embrionário e que a incubação dessas vesículas em ambiente controlado (incubadora) não inibiu a produção, mas é possível observar que há uma variação no tamanho médio das vesículas de acordo com a forma de armazenamento. A variação no diâmetro médio das vesículas, de acordo com a forma de armazenamento e o tempo de incubação, pode ser observado na Figura 1 e na Figura 2.

Tabela 1. Diâmetro médio (em nm ± EPM) de vesículas lipídicas (MLVs) produzidas de modo distinto (água ou meio de cultivo), sob três concentrações e armazenadas segundo os tratamentos (refrigeração ou incubação) e tempos (24 ou 48 horas).

Grupos	Forma de armazenamento		
	Refrigeração	Incubação (24h)	Incubação (48h)
Meio de cultivo embrionário 1,0mmol/L	414,67±43,62$^{b\ B}$	1.490,67±202,56$^{a\ A}$	454,35±32,18$^{cd\ B}$
Meio de cultivo embrionário 1,5mmol/L	704,87±88,74$^{b\ A}$	848,40±129,01$^{bc\ A}$	604,46±62,45$^{bc\ A}$
Meio de cultivo embrionário 2,0mmol/L	500,67±39,28$^{b\ AB}$	380,93±34,99$^{cd\ B}$	539,93±37,88$^{bcd\ A}$
Água Ultrapura 1,0mmol/L	1.146,33±111,30$^{a\ A}$	998,27±125,09$^{b\ A}$	860,00±63,02$^{a\ A}$
Água Ultrapura 1,5mmol/L	1.073,20±141,74$^{a\ A}$	684,20±57,92$^{bcd\ B}$	716,06±49,18$^{ab\ B}$
Água Ultrapura 2,0mmol/L	621,20±44,03$^{b\ A}$	358,00±35,03$^{d\ B}$	388,33±37,17$^{d\ B}$

Letras diferentes indicam diferença pelo teste de Tukey (P<0,05). As letras minúsculas (na coluna) indicam diferença (P<0,05) entre os grupos, mantidos sob a mesma forma de armazenamento. As letras maiúsculas (na linha) indicam diferença dentro de um mesmo grupo quando armazenado de maneiras distintas.

Como observado na Tabela 1, houve formação de vesículas multilamelares em todos as formas de armazenamento e concentrações. A formação e a organização das vesículas lipídicas são complexas, tal complexidade faz com que o estudo das interações das vesículas lipídicas seja de difícil compreensão. A interação das vesículas com o meio de produção, temperatura, o receptor alvo e, a interação entre as próprias vesículas são fatores que podem influenciar a estabilidade e a finalidade dessas vesículas (PHILLIPS *et al.*, 2009).

Atualmente, não há informações publicadas sobre a produção e a estabilidade de vesículas lipídicas multilamelares quando incubadas nas condições de cultivo embrionário *in vitro*. Ainda, não há relatos que descrevam a embriotoxicidade no uso de MLVs quando em co-cultivo com embriões bovinos produzidos *in vitro*. Que seja de nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho a investigar tais aspectos.

Lasic (1993), relata que a grande causa de instabilidade das vesículas é sua interação com outros componentes, principalmente proteínas, sais e minerais, portanto o meio de cultivo embrionário, em tese, poderia ser um limitante para a utilização de MLVs na produção *in vitro* de embriões. De fato, o meio de cultivo embrionário contém sais e minerais (cloreto de sódio, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio e potássio), aminoácidos (L-glutamina, aminoácidos essenciais e não essenciais) e hormônios, que auxiliam o desenvolvimento do embrião até o estágio de blastocisto (GONÇALVES *et al.*, 2002). Além desses componentes, a temperatura de incubação mimetiza o organismo *in vivo* do animal (38,5ºC). Esses componentes poderiam alterar a estabilidade da vesícula lipídica, mas, segundo os dados obtidos, tanto os sais minerais, os aminoácidos e os hormônios presentes no meio de cultivo não impediram a formação das MLVs. A temperatura de incubação não impediu, de modo adicional, a manutenção das MLVs formadas com o meio de cultivo embora, no transcorrer do período de 48 horas de incubação, tenha havido uma diminuição dinâmica no diâmetro médio das vesículas.

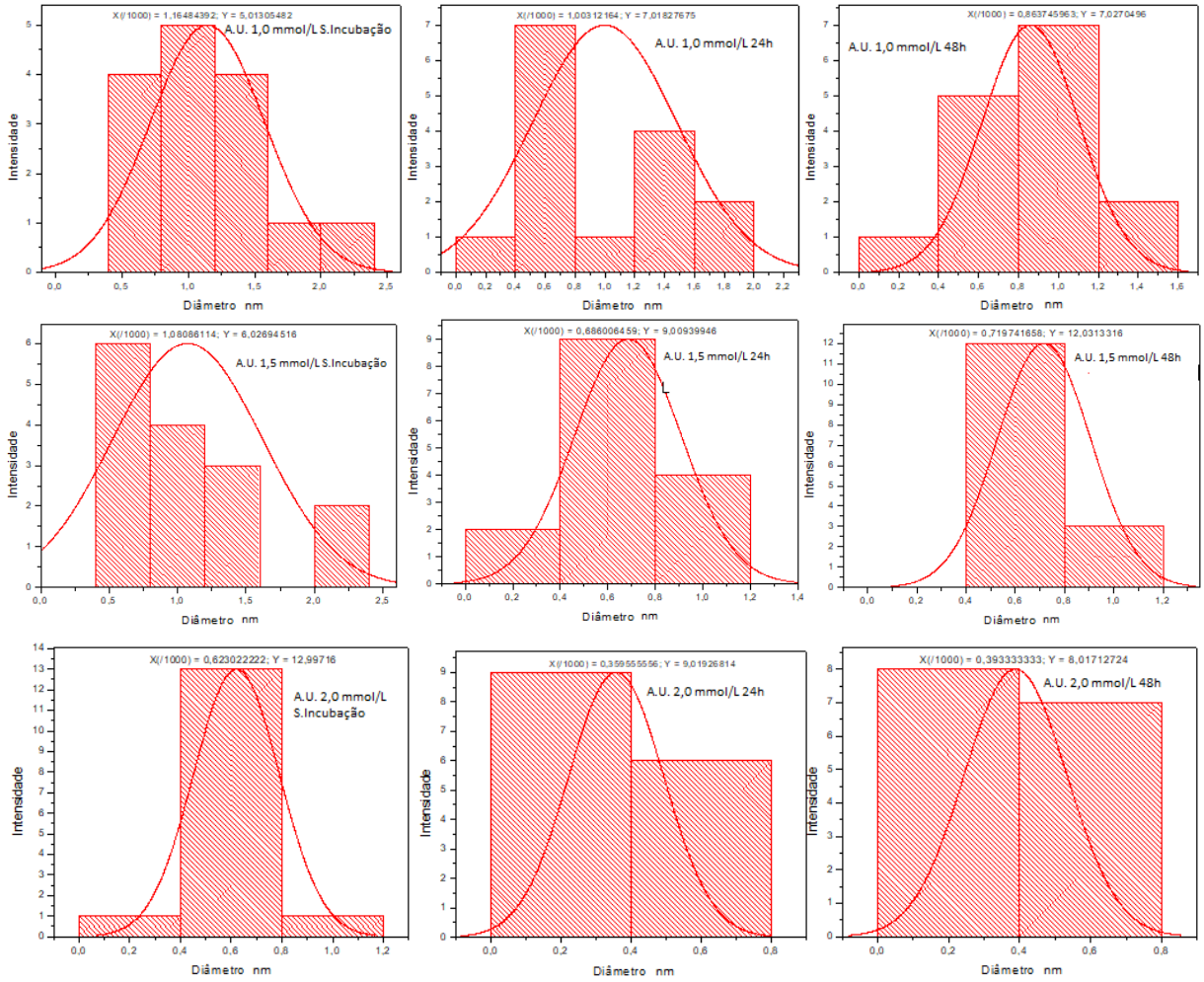
O DPPC é um lipídio que tem como característica a facilidade na formação de vesículas, podendo formar vesículas em temperatura ambiente, porém, é observado que com o aumento da temperatura há uma maior formação de vesículas. Esse fato pode ser devido ao aumento da atração entre as vesículas com carga positiva e pedaços de lipídios que não formaram vesículas completas, aumentado assim o número total de vesículas. De fato, em estudos anteriores foi demonstrado que pode

ocorrer variação na carga da vesícula e que pode variar de acordo com a força iônica do meio em que é produzida (GARCIA-MANYES; ONCINS; SANZ, 2005).

Portanto, neste experimento, a interação entre temperatura e as cargas iônicas contidas no meio de cultivo embrionário, pode ter sido o fator determinante para a produção de vesículas de menor tamanho e estáveis de acordo com o tempo de incubação. Esse fato foi observado por Garcia-Manyes; Oncins; Sanz, (2005), que verificaram a fusão completa de vesículas modificando a temperatura em 15º C. Kontro e colaboradores (2016) também observaram que o tamanho das vesículas de DPPC foram influenciados pela carga do meio em que as vesículas foram produzidas, relatando que com o aumento de líquidos iônicos, o diâmetro médio das vesículas diminui.

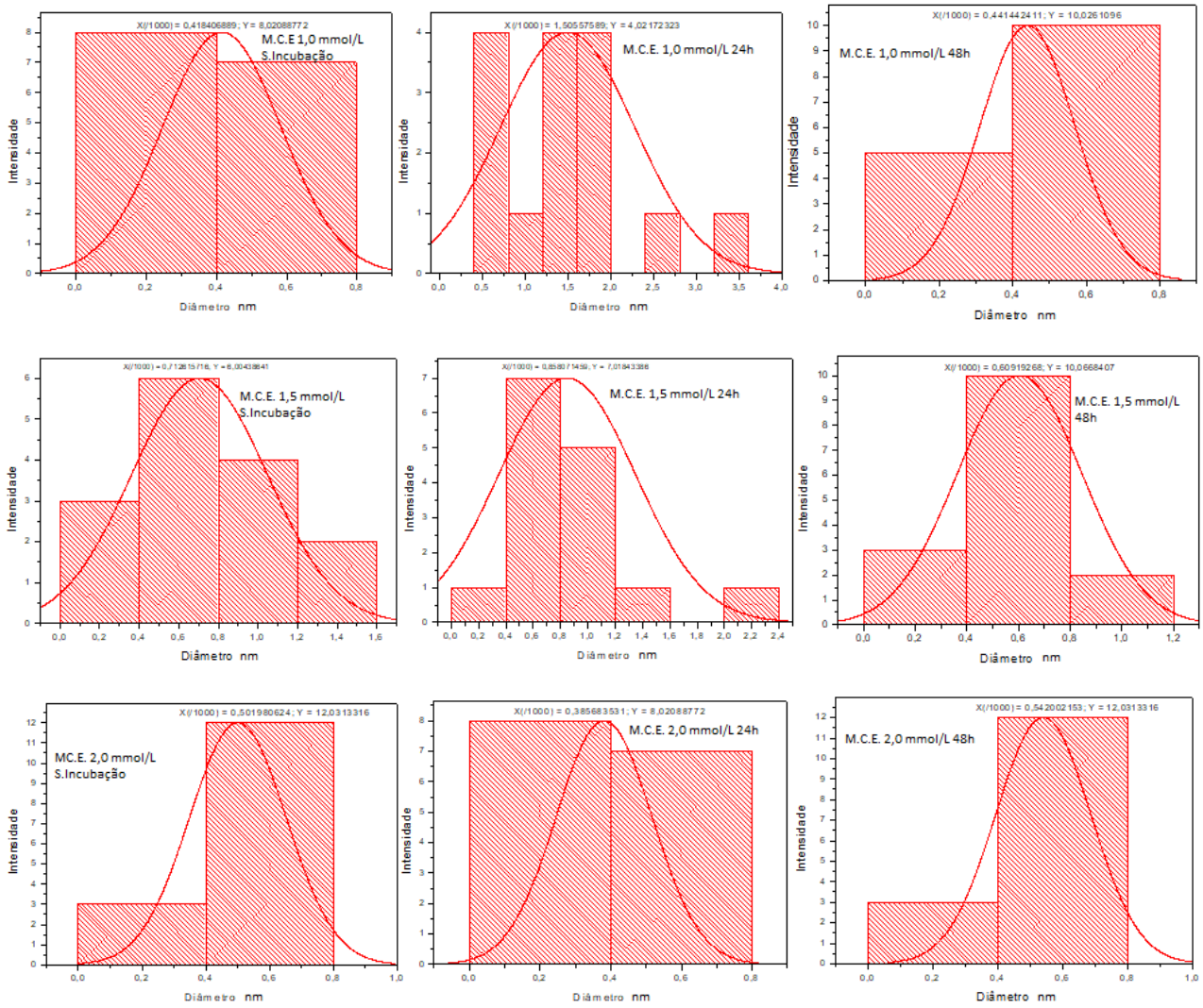
Porém, o atual estudo não pode afirmar qual componente do meio de cultivo embrionário foi o responsável por esse fato observado. Podendo ser objeto de pesquisas futuras.

Figura 1. Representação gráfica da análise de DLS de vesículas lipídicas multilamelares produzidas em água ultrapura e armazenadas em refrigeração ou incubação por 24 ou 48 horas. Diâmetro em nm.



Vesículas lipídicas produzidas em água ultrapura (A.U.) nas concentrações de 1,0, 1,5 e 2,0 mmol/L e armazenadas em refrigeração (S.Incubação) ou incubadas por 24 (24h) ou 48 horas (48h).

Figura 2. Representação gráfica da análise de DLS de vesículas lipídicas multilamelares produzidas em meio de cultivo embrionário e armazenadas em refrigeração ou incubação por 24 ou 48 horas. Diâmetro em nm.



Vesículas lipídicas produzidas em meio de cultivo embrionário (M.C.E..) nas concentrações de 1,0, 1,5 e 2,0 mmol/L e armazenadas em refrigeração (S.Incubação) ou incubadas por 24 (24h) ou 48 horas (48h).

3.2. Embriotoxicidade

A taxa de clivagem e de desenvolvimento embrionário na presença e na ausência de vesículas multilamelares estão apresentadas na Tabela 2. Não foi observada diferença estatística entre as concentrações analisadas e o grupo controle (P>0,05). Isso foi repetido na produção de blastocistos, quando o grupo controle foi comparado com os demais grupos experimentais. O grupo controle e o grupo tratado

com a maior concentração (G5) não diferiram na taxa de blastocistos produzidos (44,5 e 38,7 %, respectivamente).

Teoricamente, para um veículo entregar moléculas pelo contato direto com a membrana plasmática da célula embrionária, ele deveria ter um diâmetro que permitisse passar pelos poros existentes na zona pelúcida de embriões bovinos. Segundo VANROOSE *et al.* (2000), esses poros aumentam em quantidade, mas diminuem em diâmetro, de acordo com o desenvolvimento embrionário. No estágio de 8 células o embrião apresenta em média 1.658 poros (com o diâmetro médio de 203 nm), enquanto no estágio de mórula há 3.259 poros (média de 155 nm de diâmetro). O diâmetro médio das MLVs produzidas em meio de cultivo embrionário foi compatível com o diâmetro dos poros encontrados na zona pelúcida de embriões bovinos. Na concentração de 1,5 mmol/L, as vesículas produzidas em meio de cultivo embrionário e incubadas tinham um diâmetro médio de 848,40 nm e 604,46 nm (24 e 48 horas, respectivamente). Na concentração de 2,0 mmol/L foram produzidas vesículas com diâmetro médio de 380,93 nm e 539,93 nm (24 e 48 horas, respectivamente), o que é compatível com o tamanho da zona pelúcida embrionária. Desse modo, teoricamente, seria possível a passagem das vesículas através da zona pelúcida e a sua assimilação, mediante fusão com a membrana plasmática da célula embrionária.

Tabela 2. Desenvolvimento de embriões bovinos cultivados *in vitro* no D7, na presença ou na ausência de vesículas multilamelares e quando estas foram adicionadas no D5 de cultivo.

Grupos	Oócitos Totais	Clivados	Bi	Bl	Bx	Be	Blastocistos Totais
Controle	272	238 (87,5%)	17 (14,0%)	39 (32,2%)	53 (43,8%)	12 (9,9%)	121 (44,5%)
G1 (1,0 mmol/L)	273	241 (88,3%)	8 (6,3%)	41 (32,5%)	67 (53,2%)	10 (7,9%)	126 (46,2%)
G2 (1,25 mmol/L)	281	252 (89,7%)	8 (6,6%)	42 (34,7%)	58 (47,9%)	13 (10,7%)	121 (43,1%)
G3 (1,5 mmol/L)	270	232 (85,9%)	11 (10,3%)	35 (32,7%)	51 (47,7%)	10 (9,3%)	107 (39,6%)
G4 (1,75 mmol/L)	287	237 (82,6%)	5 (5,3%)	30 (31,9%)	48 (51,1%)	11 (11,7%)	94 (32,8%)
G5 (2,0 mmol/L)	274	232 (84,7%)	6 (5,7%)	38 (35,8%)	59 (55,7%)	3 (2,8%)	106 (38,7%)

Os dados são apresentados em forma de números totais e porcentagem (%). Bi (blastocisto inicial), Bl (blastocisto), Bx (blastocisto expandido), Be (blastocisto eclodido) e Blastocistos totais (somatória de todos os estágios de blastocisto observados em D7). A porcentagem de Clivados e Blastocistos totais são baseadas no número total de Oócitos totais. As porcentagens de Bi, Bl, Bx e Be são baseadas no número total de Blastocistos Totais. Não houve diferença significativa entre os grupos controle (Controle) e os grupos tratamento (G1; G2; G3; G4 e G5).

Embora haja a presença de aminoácidos, carboidratos, proteínas, lipídios e fosfolipídios no fluido do oviduto (AGUILAR E REYLEY, 2005; AVILE´S et al., 2010) durante o desenvolvimento embrionário in vivo, a utilização de MLVs no co-cultivo com embriões bovinos poderia ser letal ou tóxica para eles. Segundo Ramos (2008), qualquer substância exógena adicionada durante o desenvolvimento embrionário é considerada perigosa em princípio. Estudos que analisaram a qualidade embrionária, indicaram que o conteúdo lipídico intracelular é um ponto crítico na qualidade e viabilidade do embrião produzido. O excesso de lipídios acumulados intracelularmente aumenta a sensibilidade dos embriões ao estresse oxidativo e à criopreservação (AL DARWICH et al., 2011), impossibilitando ou prejudicando o desenvolvimento pós criopreservação. Apesar de ser uma substância exógena, o uso de MLVs não causou, aparentemente, qualquer toxicidade ou letalidade observável nos embriões até o D7 do cultivo in vitro. De acordo com os resultados obtidos, não houve variação significativa entre o grupo controle (44,5%) e os grupos tratados G1, G3 e G5 (46,2%; 39,6% e 38,7%, respectivamente). Mesmo quando comparado entre os grupos extremos (isto é, o grupo controle e o grupo de maior concentração), não houve diferença significativa na taxa de blastocisto produzido.

As MLVs foram estáveis em diferentes ambientes e, mesmo sendo produzidas com meio de cultivo embrionário e submetidas à temperatura de 38º C, mantiveram a sua integridade. Desse modo e ao menos durante as condições e o período avaliado neste estudo, o uso de MLVs é factível e pode ser uma ferramenta útil para futuras pesquisas que desejem prospectar potenciais usos alternativos para elas. Pela estabilidade observada das MLVs nos dados obtidos, é possível o seu uso no co-cultivo com embriões e, ainda que não tenha sido investigado, aventamos que também o seja com oócitos.

Em conclusão, as MLVs produzidas com meio de cultivo *in vitro* e incubadas durante 48 horas com embriões bovinos, demonstraram ser estáveis e com diâmetro compatível aos encontrados nos poros da zona pelúcida dos embriões. Além disso, elas não foram, aparentemente, tóxicas ou letais para os embriões quando em co-cultivo durante o tempo estudado. Desse modo, é aberta uma perspectiva para uma nova linha de estudos que aprofundem a real utilidade dessa ferramenta (as MLVs) em etapas da produção *in vitro* de embriões bovinos e posteriores biotécnicas como a vitrificação.

5. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos parceiros Monique Lemos, Eloi da Silva Feitosa do Departamento de Física da Unesp – São José do Rio Preto, e aos parceiros do Laboratório de Fisiologia da Reprodução, Araçatuba – SP, Giovana Barros Nunes e Cíntia Rodrigues da Silva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, J.; REYLEY, M. The uterine tubal fluid: secretion,composition and biological effects. **Anim. Reprod***.* 2, 91–105, 2005.

AL DARWICH, A.; PERREAU, C.; PETIT, M.H.; PAPILLIER, P.; DUPONT, J.; GUILLAUME, D.; MERMILLOD, P.; GUIGNOT. Effect of PUFA on embryo cryoresistence, gene expression and AMPKα phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. Prostaglandins and other lipid mediators, v.93, p.30-36, 2010.

AOKI, P. H. B. *Sistemas Bioinspirados Aplicados no Estudo de Interação e Sensoriamento de Derivados Xantênicos*. 2014. 127f. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho” – UNESP, Presidente Prudente, 2014.

AVILE´S, M.; GUTIE´RREZ-ADA´N, A.; COY, P. Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? **Mol. Hum. Reprod.** 16, 896–906, 2010. doi:10.1093/MOLEHR/GAQ056

BOUKANY, P. E.; MORSS, A.; LIAO, W. C.; HENSLEE, B.; JUNG, H. C.; ZHANG, X. L.; YU, B.; WANG, X. M.; WU, Y.; LI, L.; GAO, K. L.; HU, X.; ZHAO, X.; HEMMINGER, O.; LU, W.; LAFYATIS, G. P.; LEE, L. J. Nanochannel electroporation delivers precise amounts of biomolecules into living cells. **Nat. Nanotechnol**, 6, 747−754, 2011

BROOKS, M.S. e MOGGRIDGE, G.D. The Effect of Additives and the Stability of Multilamellar Vesicles in a Commercial Surfactant System. **Chemical Engineering Research and Design**, vol.84, 139-146, 2006.

CARMONA-RIBEIRO AM. Interactions Between Cationic Liposomes and Drugs or Biomolecules. **An Acad Bras Ciência**., 72:39-43, 2000.

CONNER, S. D.; SCHMID, S. L. Regulated portals of entry into the cell. **Nature**, 422, 37−44, 2003

CHENG, H. T., LONDON, M., LONDON, E. Preparation and Properties of Asymmetric Vesicles That Mimic Cell Membranes. Effect upon Lipid Raft Formation and Transmembrane Helix Orientation. **J. Biol. Chem**. 284, 6079-92, 2009.

FRÉZARD F. Lipossomes: From Biophysics to the design of peptide vaccines. **Braz J Med Biol Res,** 32(2):181-9, 1999.

FRÉZARD F., SCHETTINI, D.A., ROCHA, O.G.F., DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Quim Nova**, 3:511-8, 2005.

GARCIA-MANYES, S.; ONCINS, G.; SANZ, F. Effect of ion-binding and chemical phospholipid structure on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. Biophys. J., 89, 1812–1826, 2005.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: **Varela**, p.195- 226. 2002.

HOCHI, S.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of *in vitro*- produced bovine morulae. **Theryogenology**, v.52, p. 497-504, 1999.

KARAGIANNIS, E. D.; URBANSKA, A. M.; SAHAY, G.; PELET, J. M.; JHUNJHUNWALA, S.; LANGER, R.; ANDERSON, D. G. Rational design of a biomimetic cell penetrating peptide library. **ACS Nano,** 7, 8616−8626, 2013.

KONTRO, I.; SVEDSTRÖM, K.; DUŠA, F.; AHVENAINEN, P.; RUOKONEN, S-K.; WITOS, J.; WIEDMER, S.K. Effects of phosphonium-based ionic liquids on phospholipid membranes studied by small-angle X-ray scattering. **Chem Phys Lipid** 201:59–66, 2016.

LASIC, D. D. *Liposomes*: from physics to applications. 1ª ed. Amsterdam: **Elsevier Science Publishers B. V**., cap.3, p.63-90, 1993.

LIMA, I. M. T.; SOUZA, A. L. Desenvolvimento e sobrevivência de embriões no período de pré-implantaçao: enfoque em ruminantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim**., V.33, p.194-202, 2009

NAYAK, S.; HERZOG, R. W. Progress and prospects: immune responses to viral vectors. **Gene Ther.**, 17, 295−304, 2010.

PAGANO, R. E.; WEINSTEIN, J. N. Interactions of liposomes with mammalian cells. **Ann. Rev. Biophys. Bioeng**., 7, 435-68, 1978.

PEREIRA, R.M.; CARVALHAIS, I.; PIMENTA, J.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.; *et al*. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. **Anim Reprod Sci**, 106: 322–32, 2008.

Phillips, R.; Ursell, T.;Wiggins, P.; Sens, P. Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. **Nature**, *459*, 379–385, 2009.

RAMOS, W. L. P.; BENEVENTO, C. E.; MALGARIN, J.; STEFANELLO, T. F.; RAMOS, E. R. de P. Análise do uso de medicamentos durante a gestação em mães de

pacientes portadores de malformações fetais**. Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 59-64, jan./abr. 2008.

RAZZA, E.M.; R.A. Satrapa, C.F. Silva, T. Nabhan, R.A.L. Simões, I.P. Emanuelli, J. Mazucheli, C.M. Barros, M.F.G. Nogueira. Lethal effect of high concentrations of Parecoxib and Flunixin meglumine on the *in vitro* culture of bovine embryos**. Anim. Reprod.**, v.9, n.2, p.80-85, Apr./Jun. 2012.

SHAREI, A.; ZOLDAN, J.; ADAMO, A.; SIM, W. Y.; CHO, N.; JACKSON, E.; MAO, S.; SCHNEIDER, S.; HAN, M. J.; LYTTON-JEAN, A.; BASTO, P. A.; JHUNJHUNWALA, S.; LEE, J.; HELLER, D. A.; KANG, J. W.; HARTOULAROS, G. C.; KIM, K. S.; ANDERSON, D. G.; LANGER, R.; JENSEN, K. F. A vector-free microfluidic platform for intracellular delivery. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A**, 110, 2082−2087, 2013.

STETEFELD, J.; MCKENNA, S.A.; PATEL, T.R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophys Rev.**, 8: 409-427, 2016. DOI 10.1007/s12551-016-0218-6

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

VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 9, p112–124, 2008.

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; CHARLIER, G.; VAN OOSTRELDT, P.V.; DE KRUIF, A. Structural aspects of the zona pellucida of in vitro-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. Biology of Reproduction, n.62, p.463-469, 2000.

VASIR, J. K.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. **Adv. Drug Delivery Rev**, 59, 718−728, 2007.

WELLS, D. J. Gene therapy progress and prospects: Electroporation and other physical methods. **Gene Ther**., 11, 1363− 1369, 2004.

WITTRUP, A.; AI, A.; LIU, X.; HAMAR, P.; TRIFONOVA, R.; CHARISSE, K.; MANOHARAN, M.; KIRCHHAUSEN, T.; LIEBERMAN, J. Visualizing lipid formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown. **Nat. Biotechnol**., 33, 870−876, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Principles for evaluating health risks to progeny associated with exposure to cheminicals during pregnancy. **Geneva**: WHO, 1984.

ARTIGO 2

Mudança do perfil lipídico da membrana celular em embriões bovinos co-cultivados com vesículas lipídicas multilamelares

Manuscrito de acordo com as normas de publicação do periódico “Reproductive Biology” (fator de impacto 1.446).

Mudança do perfil lipídico da membrana celular em embriões bovinos co-cultivados com vesículas lipídicas multilamelares

Hugo De Rossi [a], Luana Teixeira Rodrigues-Rossi [bc], Daniele Fernanda de Oliveira Rocha [e], Ana Valéria Colnaghi Simionato [e], Gisele Zoccal Mingoti [bc], Pedro Henrique Benites Aoki [d], Marcelo Fábio Gouveia Nogueira [a]

[a] Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Micromanipulação Embrionária, Av. Dom Antônio 2100, Assis, São Paulo, Brasil.
[b] Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Medicina Preventiva e Reprodução Animal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castelane - S/N - Vila Industrial, Jaboticabal, São Paulo, Brasil
[c] Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária, Laboratório de Fisiologia da Reprodução, Rua Clóvis Pestana 793, Araçatuba, São Paulo, Brasil
[d] Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Departamento de Biotecnologia, Av. Dom Antônio 2100, Assis, São Paulo, Brasil.
[e] Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Laboratório Tho*MS*on, Rua Josué de Castro, sala D 214, Cidade Universitária, Campinas, São Paulo, Brasil.

Autor correspondente: Tel: +55 18 3302 5848 Ramal: 5792. E-mail: Marcelo.fabio@assis.unesp.br (M.F.G. Nogueira)

ORCID
Marcelo Fábio Gouveia Nogueira: ID https://orcid.org/0000-0002-2239-9652
Pedro Henrique Benites Aoki: ID https://orcid.org/0000-0003-4701-6408 29
Gisele Zoccal Mingoti: ID https://orcid.org/0000-0002-3059-4458 28

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas vários avanços foram obtidos na produção *in vitro* de embriões. A técnica, juntamente com a transferência de embriões (TE), se tornou rotina em laboratórios de pesquisas científicas, principalmente na produção de bovinos. Entretanto, a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* continua sendo inferior aos obtidos *in vivo*, principalmente em relação ao metabolismo, expressão gênica e criotolerância (RIZOS *et al*., 2008).

A criopreservação expõe o embrião a procedimentos físicos, químicos e biológicos que podem lesionar o citoesqueleto celular, membrana plasmática e a zona pelúcida, podendo levar a morte celular (ALVARENGA *et al*., 2007).

A zona pelúcida é também de extrema importância no sucesso da fertilização, suas funções estão envolvidas com o impedimento da polispermia, o desenvolvimento pré-implantação e a proteção do embrião durante os estágios iniciais do desenvolvimento (EPIFANO e DEAN, 1994; WASSARMAN, 1990).

A zona pelúcida é formada por glicoproteínas e possui inúmeros poros. Esses poros aumentam em quantidade, mas diminuem em diâmetro, de acordo com o desenvolvimento embrionário. No estágio de 8 células o embrião apresenta em média 1.658 poros e diâmetro médio de 203 nm, já no estágio de mórula o embrião apresenta 3.259 poros em média e 155 nm de diâmetro médio (VAN ROOSE *et al*., 2000).

Além da zona pelúcida, o embrião necessita de outros fatores que garantam a sua viabilidade na criopreservação. A membrana plasmática é a principal estrutura danificada (principalmente a porção lipídica) durante o processo de criopreservação e o estresse osmótico o principal agente.

Durante o processo de criopreservação, a membrana plasmática é submetida a mudanças severas de volume devido a entrada e saída de crioprotetores e água intracelulares. Assim, membranas celulares que apresentem maior flexibilidade e maior permeabilidade sofrem menos lesões durante o processo de criopreservação (SEIDEL, 2006).

Durante o processo de redução de temperatura ocorre a denominada fase de transição lipídica, onde há uma transição da fase liquida para a fase de gel. Entretanto algumas regiões da membrana podem alterar irreversivelmente, comprometendo a integridade da célula, levando a morte celular (HORVATH *et al.,* 2006).

Porém esse fato é determinado pela composição e o conteúdo lipídico da célula, portanto, a modificação do perfil lipídico da membrana e do conteúdo lipídico

intracelular dos embriões podem ser considerados fatores críticos para o sucesso da criopreservação embrionária (SEIDEL, 2006).

Aproximadamente 50% da composição da membrana plasmática é de lipídios e uma única membrana pode conter mais de 100 diferentes tipos de lipídios (DE ALMEIDA *et al*., 2005). Entretanto, os mais abundantes são os fosfolipídios, seguidos pelos glicolipídios e os esteróis (VAN MEER *et al*., 2008).

Os fosfolipídios são gerados através derivação enzimática do glicerol-3-fosfato, com duas “caudas” de ácido graxo de cadeia longa. Os ácidos graxos são derivados da acetil-CoA, que se torna alongada pela esterificação recorrente em uma cadeia alifática crescente (YAMASHITA *et al.*, 2014). A proporção entre colesterol e fosfolipídio, combinada com o grau de saturação das caudas de fosfolipídios, determina as propriedades biofísicas das bicamadas lipídicas (OHVO-REKILA *et al.*, 2002), como seu comportamento na fase termal e várias propriedades físico-químicas tais como fluidez e permeabilidade (EDIDIN, 2003).

Podemos encontrar os PL em diversas composições, os mais abundantes são fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e esfingomielina (SM), mas também inclui diversas espécies moleculares como, fosfatidilinositol (PI), fosfatidilcolina ligada a éter (ePC) e fosfatidiletanolamina ligada a éter (ePE), mas apenas pequenas quantidades de fosfatidilserina (PS) (BARTZ *et al*., 2007).

Nesse cenário, Seidel (2006) propõe que há duas maneiras de aumentar a criotolerância dos embriões, modificando os métodos de criopreservação, ou então, modificando o próprio embrião para que se torne mais resistente. Portanto, o aumento da insaturação dos lipídios e a maior abundância dos fosfolipídios, principalmente as fosfatidilcolinas (PC) e as esfingomielinas (SM), poderia melhorar a criotolerância dos embriões.

Diante disso, o uso de nanotecnologias tem crescido, dentro desse campo, o desenvolvimento de vesículas lipídicas, tem recebido bastante atenção.

As vesículas lipídicas são estruturas esféricas formadas por uma bicamada lipídica, basicamente constituída por moléculas anfifílicas com a presença de um agrupamento hidrofílico e outro agrupamento hidrofóbico (uma cabeça polar e uma cauda apolar, respectivamente). A cabeça polar (hidrofílica) é determinado pelo grupo hidroxila, carboxila, amina ou fosfato e pode conter cargas positiva, negativa, caráter zwiteriônico ou neutra. A cauda apolar (hidrofóbica) pode ser saturada ou insaturada, e é constituída de uma ou duas cadeias de ácidos graxos. Os lipídios que possuem

cadeia dupla e que são encontrados na natureza podem ser classificados em categorias de acordo com a cabeça polar (glicosídeos ou fosfato) ou pelo componente de ligação entre e a cabeça e cauda (glicerol ou esfingosina), como por exemplo os glicerofosfolipídios, também chamados de fosfolipídios, lipídio mais comum utilizado na produção de vesículas lipídicas.

Vesículas lipídicas formadas a partir de fosfolipídios são amplamente utilizadas como sistema modelo para estudar os fundamentos da fusão, organização e interações entre células e vesículas (SEELIG e SEELIG, 1980; AMATORE *et al.*, 2003). Portanto, o estudo das condições dessas interações, dos ambientes e dos materiais é importante.

Entretanto, a interação entre vesículas lipídicas e embriões bovinos ainda permanece desconhecida. Uma das barreiras encontradas é a presença da zona pelúcida. A zona pelúcida apresenta uma grande quantidade de poros, que variam em quantidade e tamanho de acordo com o desenvolvimento do embrião, essa barreira dificulta a entrega. Pela facilidade na formação a partir de lipídios específicos, as vesículas poderiam ser uma ferramenta de entrega lipídica para a membrana plasmática do embrião, alterando seu perfil e fornecendo melhores condições para a criopreservação. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência das vesículas multilamelares formadas com lipídio 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), no perfil da membrana plasmática de embriões bovinos produzidos *in vitro*, através da análise de MALDI-MS (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/ mass spectrometry*).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Produção de vesículas multilamelares

Fosfolipídio 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) (Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em clorofórmio num tubo de ensaio de fundo redondo e secos com um fluxo de nitrogênio, formando uma película fina na parede do tubo. A amostra foi deixada num dissecador a vácuo por 3 horas, para remover solventes residuais. A película foi então ressuspendida em meio de cultivo SOFaaci (Synthetic Oviduct Fluid), acrescido de soro fetal bovino (2,5% v/v), BSA (5 mg/mL) e piruvato (13mM). Foram utilizadas três concentrações não embriotóxicas diferentes, G1 (1,0mmol/L), G3 (1,5mmol/L) e G5 (2,0mmol/L).

2.2. Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões, maturação, fertilização e cultivo foi baseada em Rocha-Frigoni *et al.* (2016), com exceção do cultivo *in vitro*, no quinto dia de cultivo (D5) dos embriões é realizado o *feeding*, para isso, retira-se 50 µL do volume original e foi adicionado 50 µL de meio fresco contendo as MLVs.

Foram utilizados 4 grupos diferentes, o grupo controle (GC) com meio de cultivo sem vesículas, e os grupos tratamentos, contendo meio de cultivo e vesículas lipídicas, G1 (1,0 mmol/L), G3 (1,5 mmol/L) e G5 (2,0 mmol/L).

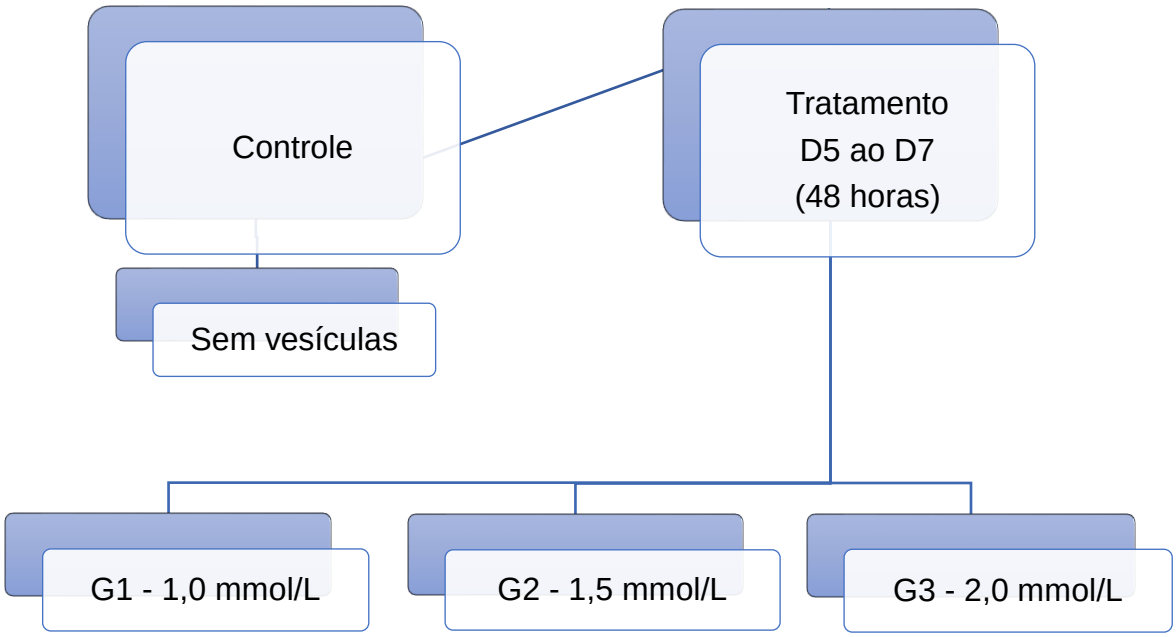


Figura 1. Esquema ilustrativo do delineamento dos grupos experimentais. Nos grupos tratamentos, as vesículas foram adicionadas no D5 e ficaram por 48 horas (D7), até o momento da análise dos blastocistos.

2.3. Análise dos lipídios de membrana por espectrometria de massas

Para a determinação do perfil lipídico de blastocistos (D7), produzidos a partir do sistema de co-cultivo com vesículas multilamelares, foi utilizada a técnica de MALDI-MS baseada em Ferreira e colaboradores, 2010.

Para tanto uma amostra contendo apenas meio de cultivo embrionário foi analisada (amostra em branco), desse modo qualquer interferência do meio de cultivo

pudesse ser descartada. A análise dos embriões foi realizada com 9 embriões (blastocistos em grau 1) de cada grupo, portanto totalizando 36 embriões, do grupos controle e dos grupos tratados foram selecionadas aleatoriamente, lavadas três vezes em PBS para eliminar quaisquer fontes de lipídio que pudessem ser provenientes do meio de cultivo, transferidos para microtubos contendo 200µL de metanol (grau ACS/HPLC) (Burdick and Jackson, Muskegon, MI, EUA) diluído em água ultrapura (Millipore, Bedford, MA, EUA) e armazenadas a -20°C durante a noite.

Para a análise de MALDI-MS, cada embrião foi lavado outra vez em solução de metanol e água ultrapura (1:1). Os embriões foram colocados na placa de MALDI. Cada embrião foi acondicionado individualmente na placa de MALDI. Antes da análise foi depositado, 1 µL de ácido diidroxibenzoico (1M) diluído em metanol, sobre cada ponto. As amostras foram secas em temperatura ambiente, até que a cristalização estivesse completa, então foram examinadas em estereomicroscópio para a confirmação da presença e da localização da amostra.

Os dados de MALDI-MS e -MS/MS foram captados nos modos “íon positivo” e “*reflectron*” por meio do espectrofotômetro de massas *Autoflex III MALDI time-of-flight mass spectrometer* (Brucker Daltonics, Bremen, Alemanha) equipado com a tecnologia de feixe de laser inteligente (*smart beam laser*). A frequência para aquisição dos dados de MS foi de 700-1200 *m/z*, utilizando a média dos tiros consecutivos de laser em frequência de 200 até que a região de interesse fosse observada e desaparecesse conforme ocorra o consumo da amostra. Como gás de colisão foi utilizado o argônio e, a checagem do espectro de massa foi feita pelo software FlexAnalysis 3.0 (Brucker Daltonics). Os íons mais intensos (distintos de possíveis ruídos da técnica oriundos da exclusão de picos isotópicos) foram considerados para cada espectro e utilizados como ponto de partida para localizar valores de *m/z* que correspondam aos lipídios de interesse (FERREIRA *et al.*, 2010; SUDANO *et al*., 2012).

2.4. Análise estatística

Para os perfis lipídicos por MS foram utilizados modelos estatísticos multivariados e univariados. Uma análise dos componentes principais (PCA) foi realizada usando Pirouette v.3.11 (Infometrix, Inc.) e o site MetaboAnalyst (XIA, *et al*., 2009). De acordo com os resultados da carga de PCA, os íons mais significantes que explicam a maior variância dos dados foram selecionados e submetidos a ANOVA

utilizando o procedimento GLIMMIX com software SAS para melhor analisar a significância de cada íon.

3. RESULTADOS

O atual trabalho analisou o perfil lipídico e, consequentemente sua relativa quantificação, baseado na intensidade de carga, de blastocistos bovinos co-cultivados com vesículas lipídicas multilamelares durante o cultivo *in vitro*.

Os resultados obtidos demonstraram que os embriões tratados com vesículas multilamelares tiveram mudança no perfil lipídico de membrana comparados ao grupo controle. Cada blastocisto dos grupos, sem tratamento (GC) e tratamento (G1, G3 e G5) foram analisados por MALDI-MS no modo de íon positivo, utilizando DHB, como descrito anteriormente por Sudano e colaboradores (2012). A amostra em branco, contendo apenas o meio de cultivo embrionário, está representado na Figura 1. Os íons detectados pela análise, dos embriões controle e tratados, são representados na Figura 2. As moléculas lipídicas com carga positiva (H^+ ou Na^+) correspondem aos valores de *m/z* e estão representados no eixo-*x* e, a relativa abundância (ou intensidade) desses lipídios estão descritos no eixo-*y*.

No 3D e 2D score plots do PLS-DA (Figura 3) é possível observar a separação dos grupos sem tratamento e tratados, demonstrando a clara diferenciação entre os grupos. Na Figura 4 é possível observar a diferenciação entre os grupos tratados, excluindo o grupo controle, nota-se que o grupo G3 tem perfil intermediário em relação ao grupo G1 e G5.

Após análise de PLS-DA, foram selecionadas 6 espécies de lipídios de acordo com sua significância, comparando os grupos extremos (GC x G5), a Tabela 1 descreve os valores de *m/z* e os lipídios correspondentes aos valores encontrados na literatura. A atribuição dos íons contidos na tabela foi feita de acordo com a menor diferença de massa entre o observado nos espectros de MALDI-MS, o valor calculado para os compostos segundo o LIPIDMAPS (http://www.lipidmaps.org) e baseado também em estudos realizados anteriormente (RAZZA *et al.,* 2016; SUDANO, 2016; BELAZ *et al.*, 2016; TATA *et al.*, 2013, LEÃO *et al.*, 2014).

Na Tabela 1, os fosfolipídios são descritos pelas abreviações (PC, PCe e PG), seguido pelo número total de átomos de carbono e ligações duplas nos resíduos acilo ligados ao glicerol separados por uma coluna. Como indicado na Tabela 1 há íons

atribuídos ao fosfolipídio do tipo fosfatidilcolina, 720.6 (PCe 32:0), 754.9 (PC 32:1 ou PC 34:4), 759.0 (PC 34:2) e 781.2 (PC 34:2 ou 36:5). Os glicerofosfolipídios são atribuídos aos íons, 779.1 (PG 42:4) e 797.3 (PG 44:5). Todos os íons tiveram abundância relativa maior no grupo tratado (G5) em relação ao grupo sem tratamento (GC).

Os lipídios listados na Tabela 1 foram selecionados pela discriminação dos íons no volcano plot, possibilitando identificar alterações de dados compostos nas replicatas, o volcano plot analisa a significância de um teste estatístico, permitindo a identificação de dados que exibem grandes diferenças, no presente trabalho, a intensidade de cada *m/z* entre os grupos experimentais extremos (GC x G5) foram comparados e os resultados são demonstrados no Boxplot da Figura 5. (KUMAR *et al*., 2018).

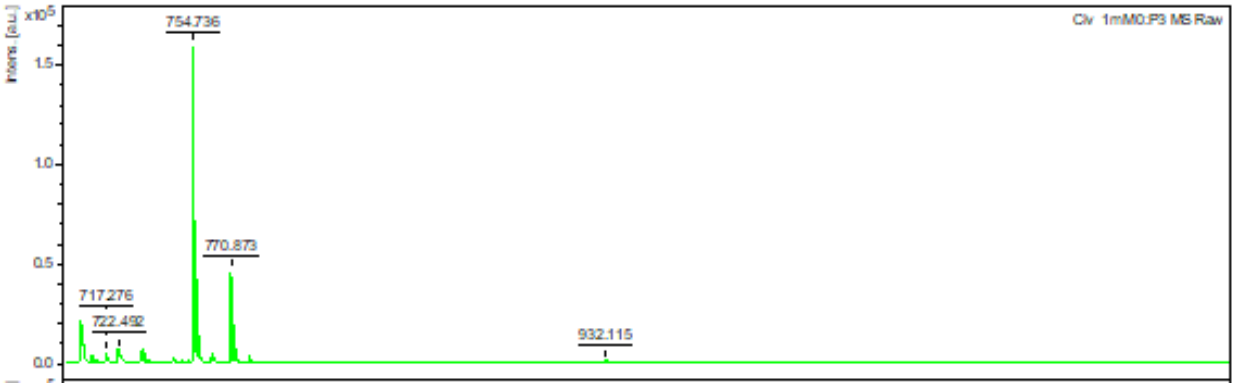


Figura 1. Maldi/MS da amostra contendo apenas o meio de cultivo embrionário, chamada de amostra em branco.

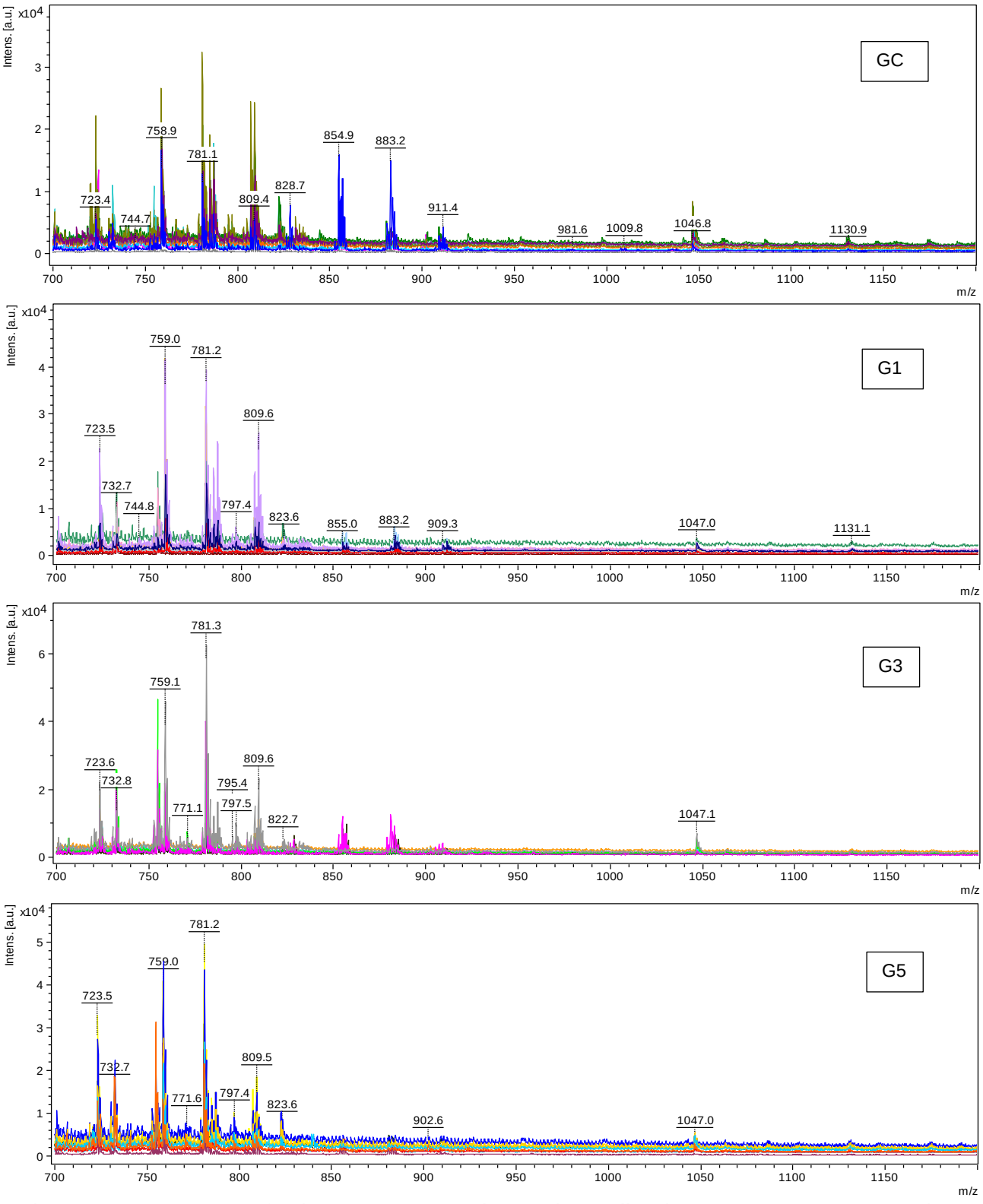


Figura 2. Representação dos grupos experimentais analisados por MALDI-MS. GC (grupo controle), G1 (1,0mmol/L), G3 (1,5mmol/L) e G5 (2,0mmol/L)

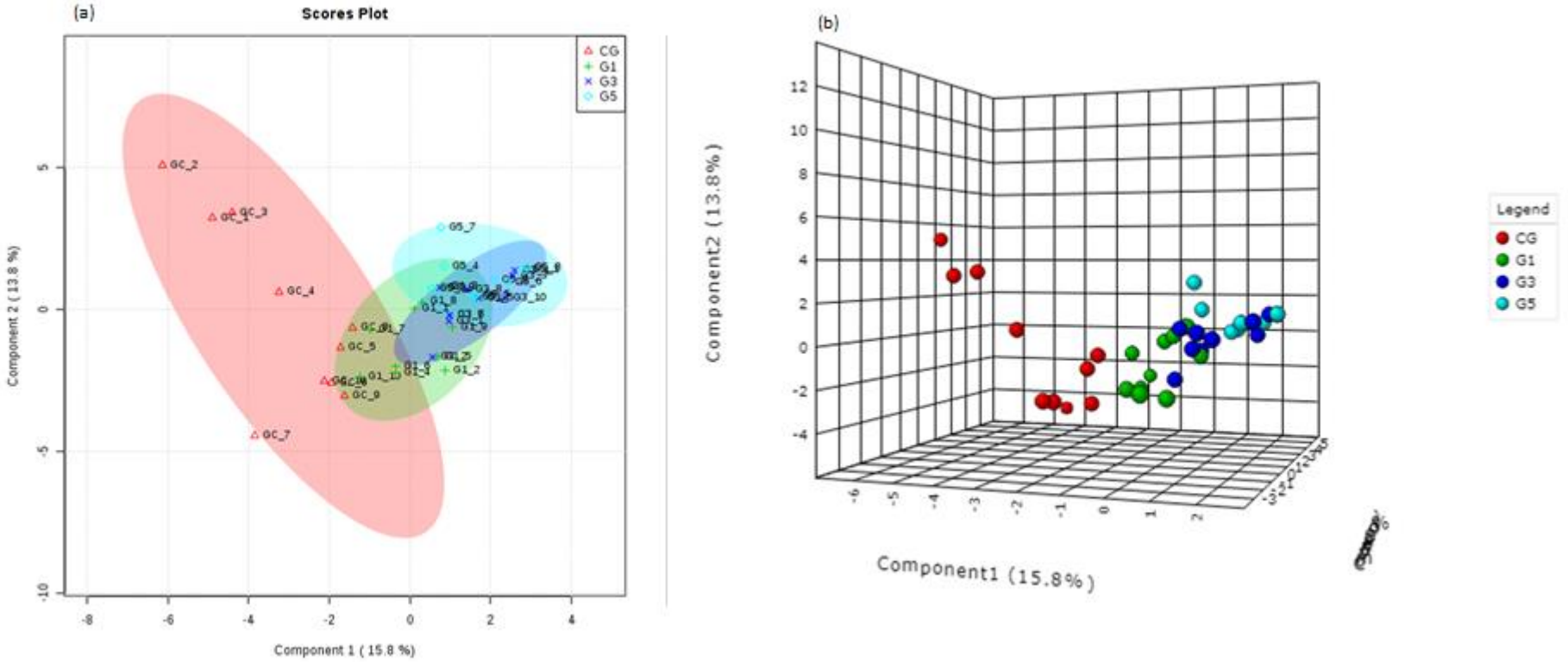


Figura 3. Score plots da PLS-DA entre o grupo controle (GC) e os grupos tratamentos (G1, G3 e G5). (a) Bidimensional PLS-DA score plot de MALDI-MS de embriões produzidos *in vitro* co-cultivados com MLVs (G1, G3 e G5) ou não (grupo Controle, GC). (b) Tridimensional score plot demonstrando os valores do grupo Controle (vermelho), G1 (verde), G3 (azul escuro) e G5 (azul claro). Cada ponto representa um blastocisto analisado, é possível observar a clara diferenciação entre os grupos controle e tratados.

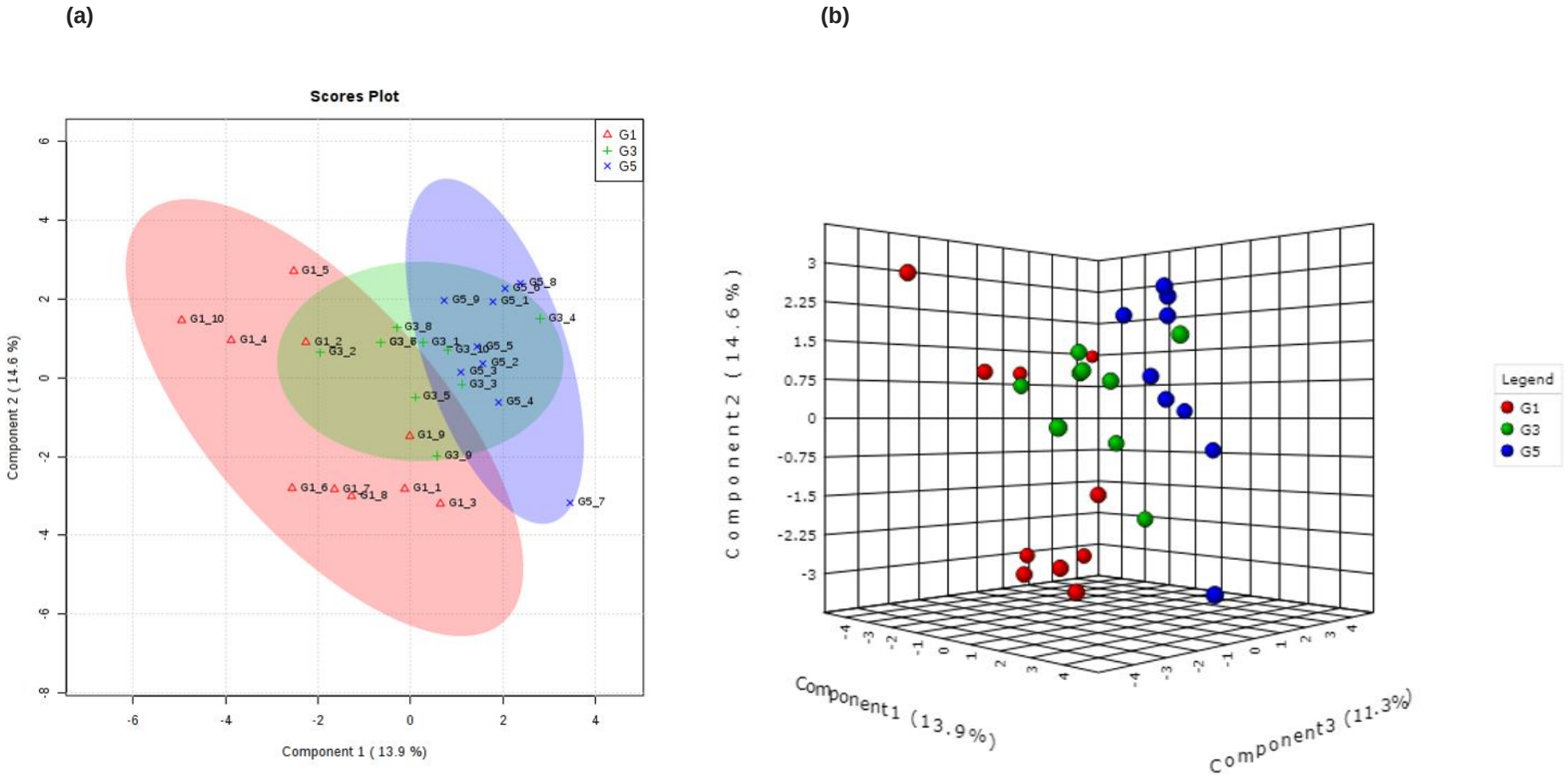


Figura 4. Score plots da PLS-DA dos grupos tratamentos (G1, G3 e G5) excluindo o grupo controle. (a) Bidimensional PLS-DA score plot de MALDI-MS de embriões produzidos *in vitro* co-cultivados com MLVs (G1, G3 e G5)). Tridimensional score plot demonstrando os valores dos grupos tratados, G1 (vermelho), G3 (verde) e G5 (azul). Cada ponto representa um blastocisto analisado, é possível observar há diferenciação entre os grupos, mas não houve discriminação entre eles, tendo o G3 com perfil intermediário.

Tabela 1. Lipídios obtidos na análise MALDI-MS responsáveis pela discriminação entre grupo controle (GC- sem vesículas) e o grupo tratamento de maior concentração de vesículas lipídicas (G5; 2,0 mmol/L).

m/z	Assinatura (NC:DP)	*m/z* Literatura
720.6	[PCe (32:0) + H]+	720.5
754.9	[PC (32:1) + Na]+; [PC (34:4) + Na]+	754.6
759.0	[PC (34:2) + H]+	758.6
779.1	[PG(42:4) + H]+	779.4
781.2	[PC (34:2)+Na]+, [PC (36:5) + H]+	780.6
797.3	[PG (44:5) + H]+	797.5

NC:DP, número de carbono: dupla ligação; fosfatidilcolina (PC); PCe (fosfatidilcolina ligada a éter) glicerofosfolipídio (PG). A atribuição de cada *m/z* foi baseada em Sudano *et al*., 2012; Sudano *et al*., 2016 e na base de dados Lipidmaps.com.

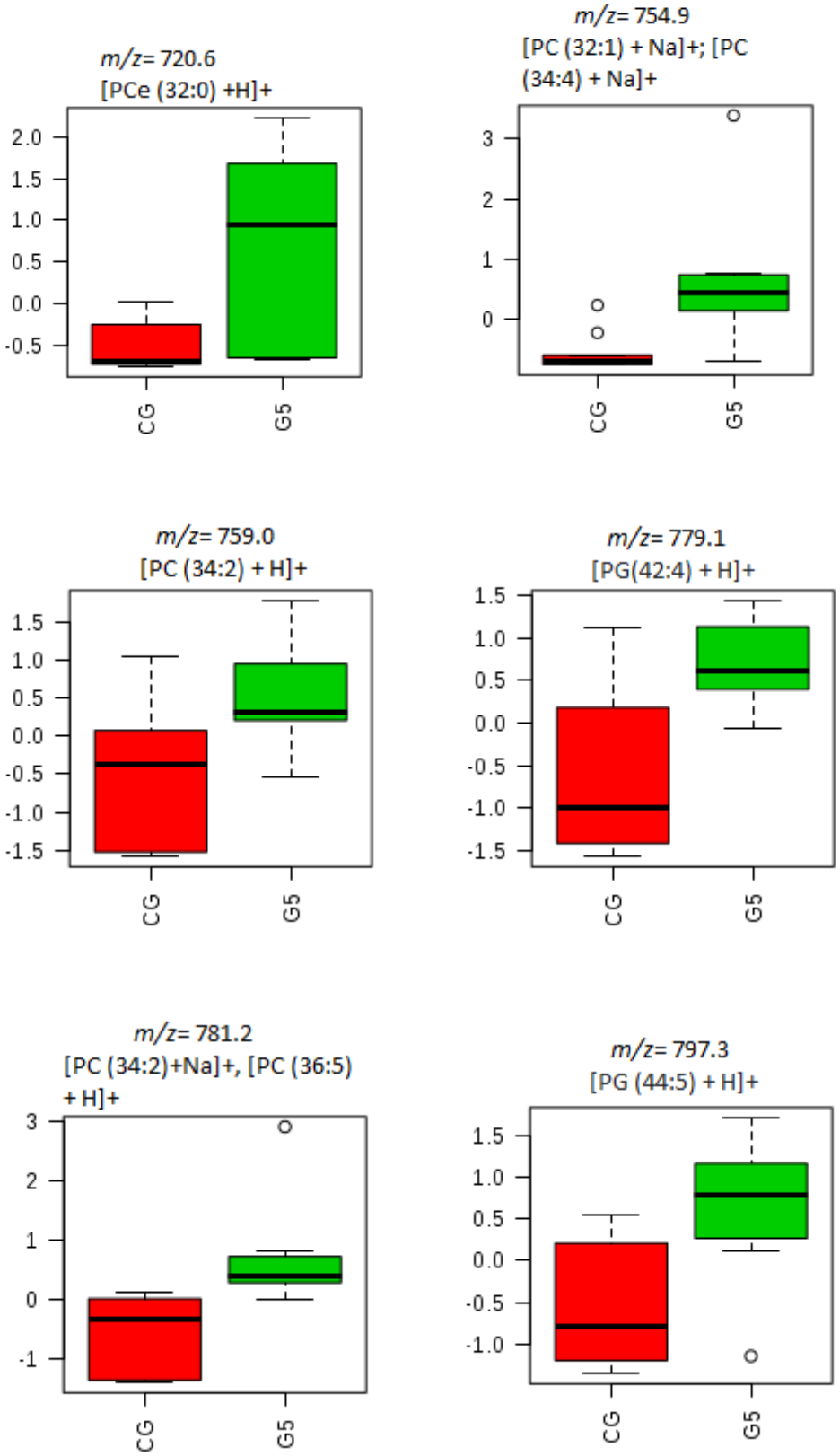


Figura 5. Boxplot representando a diferença na abundância dos seis íons significantes (m/z 720.6, 754.9, 759.0, 779.1, 781.2 e 797.3) do grupo sem tratamento (GC) e do grupo G5 (2,0mmol/L).

4. DISCUSSÃO

A alteração observada, neste estudo, do perfil lipídico da membrana das células embrionárias mediante o co-cultivo com vesículas lipídicas multilamelares é inédito. A técnica proposta, sendo pioneira, ainda carece de maiores caracterizações e estudos funcionais para determinar o mecanismo temporal e causal da alteração induzida.

A fluidez da membrana plasmática é influenciada principalmente pela composição de fosfolipídios, número de duplas ligações, proporção da quantidade de ácidos graxos insaturados e saturados, teor de proteína e nível de colesterol (JUCHEM *et al*., 2010). Portanto, a modificação de um ou mais desses fatores poderia levar à uma maior taxa de sobrevivência embrionária pós criopreservação. Desse modo, a alteração da fluidez da membrana, principalmente pelo aumento da quantidade de ácidos graxos insaturados, consequentemente aumenta também a resistência à criopreservação. Dessa forma, a adição de substâncias, possibilitando assim uma maior fluidez, como no caso dos fosfolipídios, é de grande importância (SEIDEL, 2006).

O uso de substâncias que modifiquem o perfil lipídico da membrana plasmática, direta ou indiretamente, tem sido objetivo de estudos recentes (LEÃO *et al.*, 2015; RAZZA *et al.*, 2018; SPRÍCIGO *et al.*, 2012; PEREIRA, 2008). No presente estudo, a proposta alternativa e utilizando MLVs modicou o perfil lipídico da membrana celular. Dentre os íons detectados, pela técnica de MALDI-MS, foi observado que houve um aumento relativo na abundância de 6 íons (720.6; 754.9; 759.0; 779.1; 781.2 e 797.3 *m/*z) naqueles grupos que foram submetidos ao co-cultivo com MLVs. Desses íons, três deles foram relatos como possíveis marcadores biológicos para o aumento do sucesso após a criopreservação embrionária, os íons PC 32:1 ou PC 34:4 e PC 34:2 foram relatados por Sudano *et al*. (2012), e Leão *et al*. (2015) indicou o íon PC 36:5.

De fato, Leão *et al.* (2015) observou que os íons PC 36:3 ou PC 34:0, PCe 38:2 ou PC 36:6 e PC 36:5 ou PCe 38:1, e Razza *et al.* (2018) relatou os íons PCp 34:1 ou PCe 34:2, PC 32:1, PC 36:2 e PC 36:1 como íons indicadores de qualidade em embriões criopreservados. Porém ambos os autores concordam com Sudano *et al.* (2012) ao apontar que o PC 32:1 é o lipídio mais associado com a sobrevivência pós criopreservação.

De fato, a PC é o fosfolipídio mais abundante na membrana plasmática. Portanto, com o aumento de PC é esperado que haja também o aumento da

fluibilidade de membrana, possibilitando o aumento da criotolerância. Além disso, a abundância de PC foi relacionada a reparação da membrana celular após a criopreservação (KAPLAN e SIMONI, 1985). Desse modo, o aumento na abundância de PC auxiliaria também, potencialmente, o reparo da membrana pós criopreservação, aumentando a qualidade e a viabilidade do embrião para a sua implantação (LEÃO *et* al., 2014).

De modo complementar, foi observado que a abundância de íons foi dependente da concentração de MLVs utilizada. Os grupos tratados com as maiores concentrações de MLVs tiveram os seus perfis diferentes, e de modo crescente, na abundância de íons. O grupo G3 foi intermediário entre os perfis dos grupos G1 e G5. Isso é um indicativo de que a concentração de MLVs interfere no perfil lipídico da membrana de modo direto e positivamente dependente.

Os resultados demonstram que a maior diferença de abundância nos íons foi observada entre os grupos extremos, isto é, sem tratamento (GC) e com a maior concentração de MLV (G5). Essa nítida diferenciação demonstra que a utilização de MLVs no cultivo de embriões bovinos pode modificar claramente a abundância do perfil lipídico da membrana embrionária. Esses dados reforçam os conceitos de que o meio de cultivo embrionário influencia, e de modo impactante, a qualidade e o desenvolvimento dos blastocistos (RIZOS *et al.* 2002*A*, 2002*B*, 2003; LONERGAN *et al.* 2003). Portanto, em tese o aumento na abundância de lipídios (como o PC 32:1 ou PC 34:4 e PC 34:2) pode melhorar as condições de sobrevivência pós criopreservação e contribuir para a melhoria da técnica.

O mecanismo de ação pelo qual as MLVs modificaram a abundância no perfil lipídico da membrana plasmática ainda precisa ser elucidado. Como as MLVs foram formadas a partir de um fosfolipídio (1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) que é abundante na membrana celular, possivelmente isso auxiliou na assimilação da vesícula pela membrana. Entretanto, não foi observada diretamente essa assimilação das MLVs pela membrana. Desse modo, não há como afirmar se tal fato ocorreu de modo exclusivo (isto é, a entrega direta da molécula na membrana celular pelo veículo carreador) ou, ainda, se a própria presença das MLVs alterou indiretamente o próprio metabolismo lipídico endógeno das células embrionárias. Também não foi analisado o conteúdo lipídico intracelular para determinar se houve, ou não, alteração no volume e no padrão das gotículas citoplasmáticas de lipídios. Essa resposta é de grande relevância pois, estudos que almejam melhoras na criotolerância embrionária indicam

que a qualidade da membrana plasmática e o conteúdo lipídico citoplasmático são fatores determinantes para o sucesso da criopreservação (HOCHI *et al*., 1999; PEREIRA *et al*., 2008; VAN MEER *et al.*, 2008; SUDANO *et al.*, 2012).

Em conclusão, o uso de MLVs no co-cultivo com embriões bovinos produzidos *in vitro* alterou a abundância do perfil lipídico da membrana plasmática. A maior distinção foi observada entre o grupo controle (sem MLVs) e o grupo experimental com a maior concentração de MLVs. Houve um aumento na abundância de íons relacionados com o aumento da sobrevivência pós criopreservação (PC 32:1 ou PC 34:4, PC 34:2 e PC 36:5) o que, hipoteticamente, poderia aumentar a capacidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* suportarem, com sucesso, a técnica de criopreservação.

5. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de 622 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos parceiros do Laboratório Tho*MS*on, Campinas -SP, Dra. Daniele Fernanda de Oliveira Rocha, Dra. Ana Valéria Colnaghi Simionato; e aos parceiros do Laboratório de Fisiologia da Reprodução, Araçatuba – SP, Giovana Barros Nunes e Cíntia Rodrigues da Silva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL DARWICH, A.; PERREAU, C.; PETIT, M.H.; PAPILLIER, P.; DUPONT, J.; GUILLAUME, D.; *et al*. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPKa phosphorylation in IVF-derived bovine embryos**. Prostaglandins Other Lipid Mediat,** 93:30–6, 2010.

ALVARENGA, M.A.; FERNANDES, C.B.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Criopreservação de embriões eqüinos. **Acta Sci. Vet.,** v. 35, p. 799-809, 2007.

AMATORE, C.; ARBAULT, S.; BONIFAS, I.; BOURET, Y.; ERARD, M.; GUILLE, M. **Chem-PhysChem**, 4, 147–154, 2003.

BARTZ, R.; LI, W. H.; VENABLES, B.; ZEHMER, J. K.; ROTH, M. R.; WELTI, R.; ANDERSON, R. G.; LIU, P.; CHAPMAN, K. D. Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. **J Lipid Res.**, 48, p837-847, 2007.

BELAZ, K.R.A.; TATA, A.; FRANÇA, M.R.; SILVA, M.I.S.; VENDRAMINI, P.H.; FERNANDES, A.M.A.P.; D´ALEXANDRI, F.L.; EBERLIN, M.N.; BINELLI, M. Phospholipid Profile and Distribution in the Receptive Oviduct and Uterus During Early Diestrus in Cattle. **Biology of Reproduction,** 95(6):127, 1–11, 2016.

BOTIGELLI, R.C.; RAZZA, E.M.; PIOLTINE, E.M.; FONTES, P.K.; SCHWARZ, K.R.L.; LEAL, C.L.V.; NOGUEIRA, M.F.G. Supplementing in vitro embryo production media by NPPC and sildenafil affect the cytoplasmic lipid content and gene expression of bovine cumulusoocyte complexes and embryos. **Reproductive Biology,** 18, 66–75, 2018.

DE ALMEIDA, R.F.; MOURA, L.M.; FEDOROV, A.; PRIETRO, M. Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: a time-resolved fluorescence resonance energy transfer study. **J. Mol. Biol.** 346:1109-1120, 2005.

DUNNING, K. R.; RUSSEL, D. L.; ROBKER, R. L. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and b-oxidation. **Reproduction**, 148, 15–27, 2014.

EDIDIN, M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. **Nature**, 4, 414-418, 2003.

EPIFANO, O.; DEAN, J. Biology and structure of the zona pellucida: a target for immunocontraception. **Reprod Fertil Dev**, 6:319–330, 1994.

FERREIRA, C.R.; *et al.* Single Embryo and Oocyte Lipid Fingerprinting by Mass Spectrometry. **Journal of lipid research**, v. 51, 1218-1227, 2010.

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

GÓMEZ, E.; RODRÍGUEZ, A.; MUÑOZ, M.; CAAMAÑO, J. N.; HIDALGO, C. O.; MORÁN, E.; FACAL, N.; DÍEZ, C. Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. **Theriogenology**, v. 69, n. 8, p. 1013-21, 2008.

HORVATH, G.; SEIDEL Jr., G.E. Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl-b-cyclodextrin. Theriogenology, v.66, p.1026-1033, 2006.

JUCHEM, S.O.; CERRI, R.L.A.; VILLASEÑOR, M.; GALVÃO, K.N.; BRUNO, R.G.S.; RUTIGLIANO, H.M.; DEPETERS, E.J.; SILVESTRE, F.T.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Supplementation with calcium salts of linoleic and trans-octadecenoic acids improves fertility of lactating dairy cows. **Reprod Dom Anim**, v.45, p.55–62, 2010.

KAPLAN, M.R.; SIMONI, R.D. Transport of Cholesterol from the Endoplasmic Reticulum to the Plasma Membrane. **The Journal of Cell Biology** – v.101, 446-453, 1985.

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

KUMAR, N.; HOQUE, M.A.; SUGIMOTO, M. Robust volcano plot: identification of differential metabolites in the presence of outliers. **BMC Bioinformatics,** 19:128, 2018.
doi.org/10.1186/s12859-018-2117-2.

ALVARENGA, M.A.; FERNANDES, C.B.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.
Criopreservação de embriões eqüinos. **Acta Sci. Vet.,** v. 35, p. 799-809, 2007.

LEÃO, B.C.S., ROCHA-FRIGONI, N.A.S.; CABRAL, E.C.; COELHO, M.B.; FRANCO, M.F.; FERREIRA, C.R.; EBERLIN, M.N.; FILGUEIRAS, P.R.; MINGOTI, G.Z. Membrane lipid profile monitored by mass spectrometry detected differences between fresh and vitrified *in vitro*-produced bovine embryos. **Zygote**, 2014.

LEÃO, B.C.S., ROCHA-FRIGONI, N.A.S.; CABRAL, E.C.; COELHO, M.B.; FERREIRA, C.R.; EBERLIN, M.N., ACCORSI, M.F., NOGUEIRA, E., MINGOTI, G.Z. Improved embryonic cryosurvival observed after in vitro supplementation with conjugated linoleic acid is related to changes in the membrane lipid profile. **Theriogenology,** 84:127–136, 2015.

LONERGAN, P., RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., FAIR, T., BOLAND, M. P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reprod. Domest. Anim***.* 38, 259–267, 2003.
doi:10.1046/J.1439-0531.2003.00437.X

PEREIRA, R.M.; CARVALHAIS, I.; PIMENTA, J.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.; *et al*. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. **Anim Reprod Sci**, 106: 322–32, 2008.

OHVO-REKILA, H.; RAMSTEDT, B.; LEPPIMAKI, P.; SLOTTE, J.P. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. **Prog Lipid Res**., 41(1):66–97, 2002.

RAZZA, E. M.; SATRAPA, RA; EMANUELLI, I.P.; BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M.F.G. Screening of biotechnical parameters for production of bovine inter-subspecies

embryonic chimeras by the aggregation of tetraploid Bos indicus and diploid crossbred Bos taurus embryos. **Reproductive Biology**. p.34 - 40, 2016.

RAZZA, E.M.; SUDANO, M.J.; FONTES, P.K.; FRANCHI, F.F.; BELAZ, K.R.A.; SANTOS, P.H.; CASTILHO, A.C.S.; ROCHA, D.F.O.; EBERLIN, M.N.; MACHADO, M.F.; NOGUEIRA, M.F.G. Treatment with cyclic adenosine monophosphate modulators prior to *in vitro* maturation alters the lipid composition and transcript profile of bovine cumulus–oocyte complexes and blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, 2018.
doi.org/10.1071/RD17335

RIZOS, D., LONERGAN, P., BOLAND, M. P., ARROYO-GARCI´A, R., PINTADO, B., DE LA FUENTE, J., GUTIE´RREZ-ADA´N, A. Analysis of differential mRNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biol. Reprod***.* 66, 589–595, 2002a.
doi:10.1095/BIOLREPROD66.3.589

RIZOS, D., LONERGAN, P., WARD, F., DUFFY, P., BOLAND, M. P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol. Reprod. Dev***.* 61, 234–248, 2002*b*.
doi:10.1002/MRD. 1153

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

RIZOS, D., CLEMENTE, M., BERMEJO-ALVAREZ, P., DE LA FUENTE, J., LONERGAN, P., and GUTIE´RREZ-ADA´N, A. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. **Reprod. Domest. Anim**. 43, 44–50, 2008.
doi:10.1111/J.1439-0531.2008.01230.X

ROCHA-FRIGONI, N. A. S.; LEÃO, B. C. S.; DALL'ACQUA, P. C.; MINGOTI, G. Z. Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured in vitro with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development. **Theriogenology**, p. 1- 9, 2016.

SEIDEL, G. E. Jr. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, 65, 228, 2006.

SEELIG, J.; SEELIG, A. Q. **Rev. Biophys.**, 13, 19– 61, 1980.

SUDANO, M. J.; SANTOS, V. G.; TATA, A.; FERREIRA, C. R.; PASCHOAL, D. M.; MACHADO, R.; BURATINI, J.; EBERLIN, M. N.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. 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(6), n.130, p.1–11, 2012.

SUDANO, M. J.; CAIXETA, E. S.; PASCHOAL, D. M.; MARTINS, JR, A.; MACHADO, R.; BURATINI, J. J.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos Taurus taurus in vitro*- and *in vivo*-produced blastocysts. **Reprod. Fertil. Dev***.* 26, 1129–1141, 2014.

SUDANO, M. J.; RASCADO, T. D.; TATA, A.; BELAZ, K. R.; SANTOS, V. G.; VALENTE, R. S.; MESQUITA, F. S.; FERREIRA, C. R.; ARAUJO, J. P.; EBERLIN, M. N.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. Lipidome signatures in early bovine embryo development. **Theriogenology,** 86, 472–484.e1, 2016.

SPRICIGO, J.F.; MORAIS, K.S.; YANG, B.S.; DODE, M.A. Effect of the exposure to methyl-beta-cyclodextrin prior to chilling or vitrification on the viability of bovine immature oocytes. **Cryobiology**, v.65, p.319-325, 2012.

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

TATA, A.; SUDANO, M.J.; SANTOS, V.G.; LANDIM-ALVARENGA, F.D.; FERREIRA, C.R.; EBERLIN, M.N. Optimal single-embryo mass spectrometry fingerprinting. **J. Mass Spectrom**, 48:844–849, 2013.

VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 9, p112–124, 2008.

VAN ROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; CHARLIER, G.; VAN OOSTRELDT, P.V.; DE KRUIF, A. Structural aspects of the zona pellucida of in vitro-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. Biology of Reproduction, n.62, p.463-469, 2000.

WASSARMAN, P.M. Regulation of mammalian fertilization by zona pellucida glycoproteins. **J Reprod Fertil Suppl**; 42:79–87, 1990.

YAMASHITA, A.; HAYASHI, Y.; NEMOTO-SASAKI, Y.; ITO, M.; OKA, S.; TANIKAWA, T.; WAKU, K.; SUGIURA, T. Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms**. Prog Lipid Res**., 53:18–81, 2014.

CONCLUSÃO GERAL

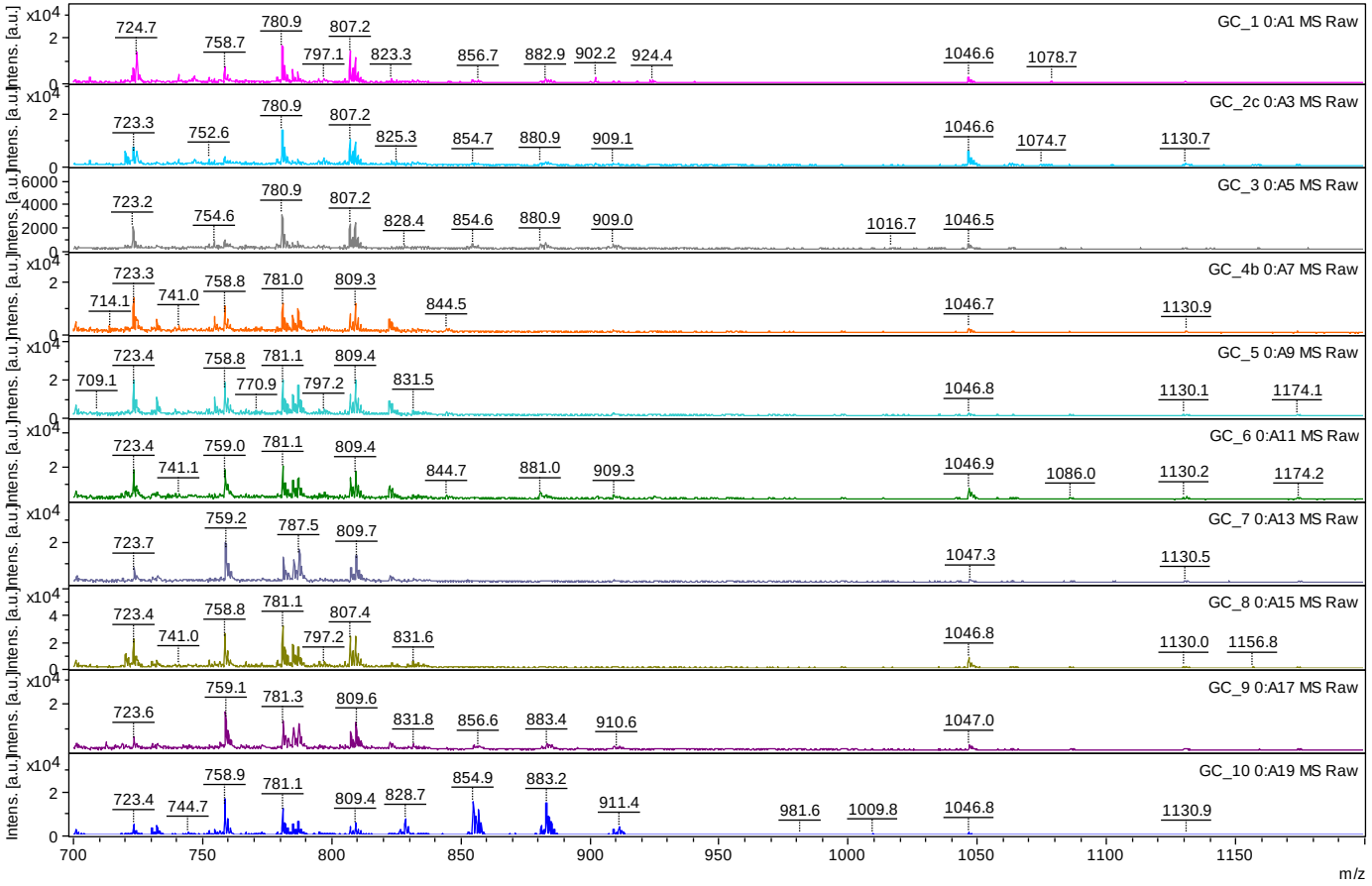
Em conclusão, a produção de vesículas lipídicas multilamelares, e a sua incubação em ambiente controlado, permitiu o desenvolvimento de vesículas estáveis e com o diâmetro compatível com os poros existentes na zona pelúcida do embrião. Desse modo, o uso das vesículas como fator de transporte de moléculas para a célula do embrião se torna uma área promissora para pesquisas futuras. Além disso, é possível concluir que a utilização das vesículas, nas concentrações testadas, não causou efeitos observáveis de toxicidade ou de letalidade quando co-cultivadas com os embriões durante 48 horas.

O uso de vesículas lipídicas multilamelares como ferramenta de entrega de lipídios exógenos, para a membrana plasmática de embriões bovinos produzidos *in vitro*, se mostra como uma potencial e promissora alternativa de manipulação da criotolerância. A alteração na abundância de alguns perfis lipídicos da membrana plasmática foi observada neste trabalho. Houve uma maior abundância de íons e, em particular, principalmente aqueles relacionados com o aumento da sobrevivência pós criopreservação (PC 32:1 ou PC 34:4 e PC 34:2). Em tese, essa alteração poderia sustentar futuras pesquisas para prospectar a funcionalidade desses embriões em termos de sua criotolerância.

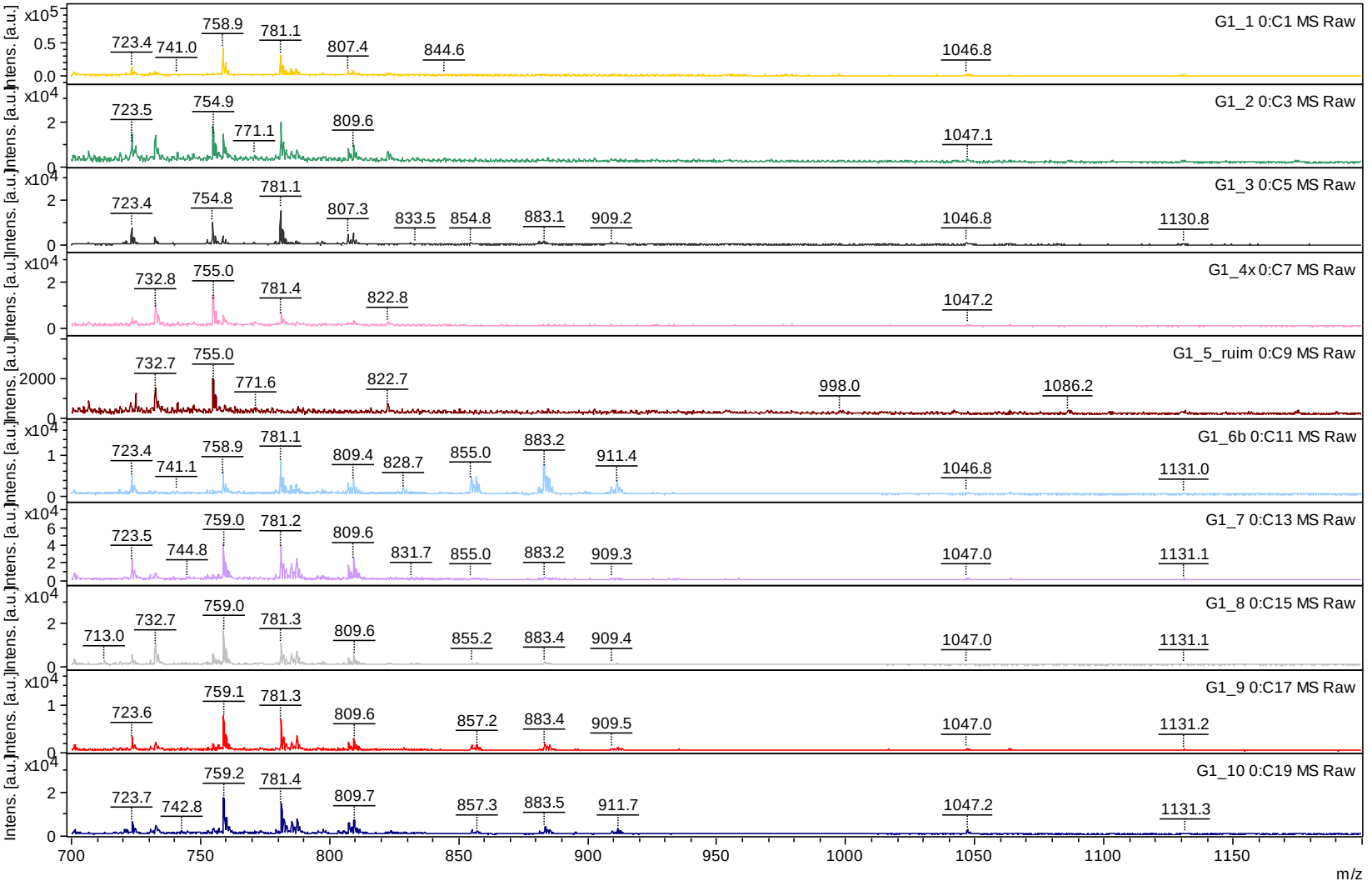
ANEXOS

Anexo A – Representação gráfica da análise de Maldi-MS dos grupos, grupo controle (GC), G1 (1.0mmol/L), G3 (1.5mmol/L) e G5 (2.0mmol/L)

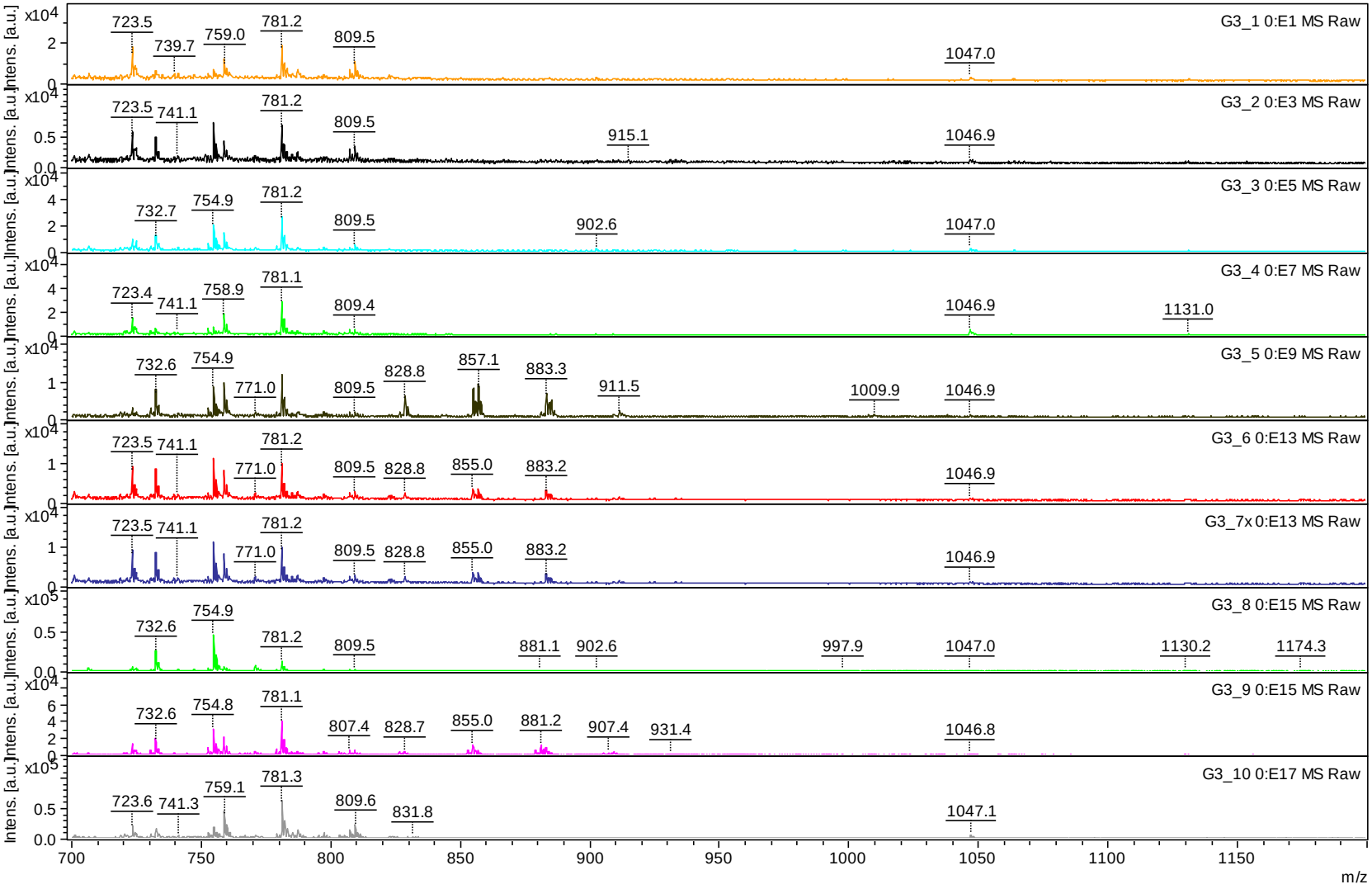
GC – Grupo Controle



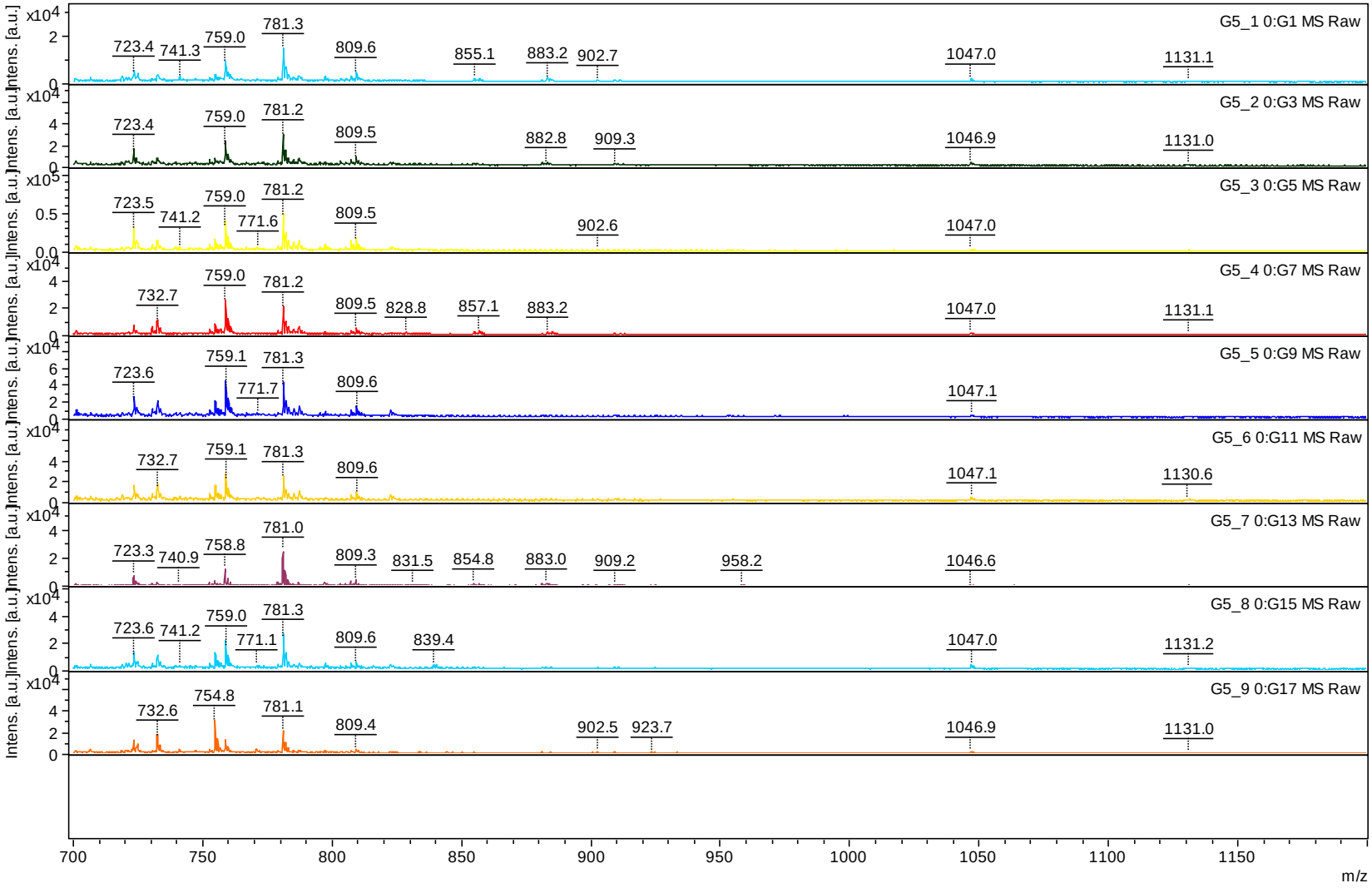
G1 – 1.0mmol/L

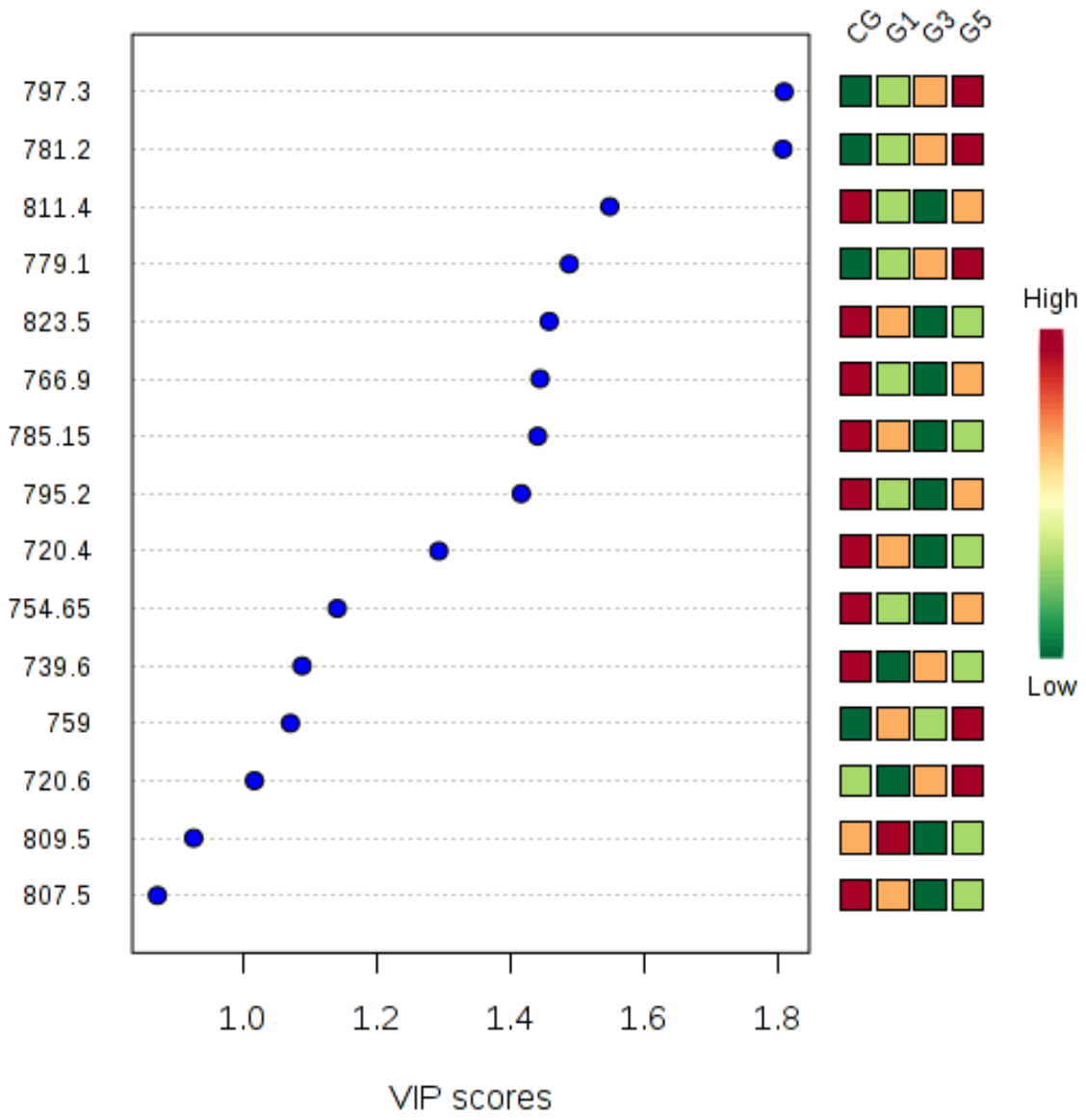

G1_1 0:C1 MS Raw
723.4
741.0
758.9
781.1
807.4
844.6
1046.8
G1_2 0:C3 MS Raw
723.5
754.9
771.1
809.6
1047.1
G1_3 0:C5 MS Raw
723.4
754.8
781.1
807.3
833.5
854.8
883.1
909.2
1046.8
1130.8
G1_4x 0:C7 MS Raw
732.8
755.0
781.4
822.8
1047.2
G1_5_ruim 0:C9 MS Raw
732.7
755.0
771.6
822.7
998.0
1086.2
G1_6b 0:C11 MS Raw
723.4
741.1
758.9
781.1
809.4
828.7
855.0
883.2
911.4
1046.8
1131.0
G1_7 0:C13 MS Raw
723.5
744.8
759.0
781.2
809.6
831.7
855.0
883.2
909.3
1047.0
1131.1
G1_8 0:C15 MS Raw
713.0
732.7
759.0
781.3
809.6
855.2
883.4
909.4
1047.0
1131.1
G1_9 0:C17 MS Raw
723.6
759.1
781.3
809.6
857.2
883.4
909.5
1047.0
1131.2
G1_10 0:C19 MS Raw
723.7
742.8
759.2
781.4
809.7
857.3
883.5
911.7
1047.2
1131.3
Intens. [a.u.]
m/z
700
750
800
850
900
950
1000
1050
1100
1150

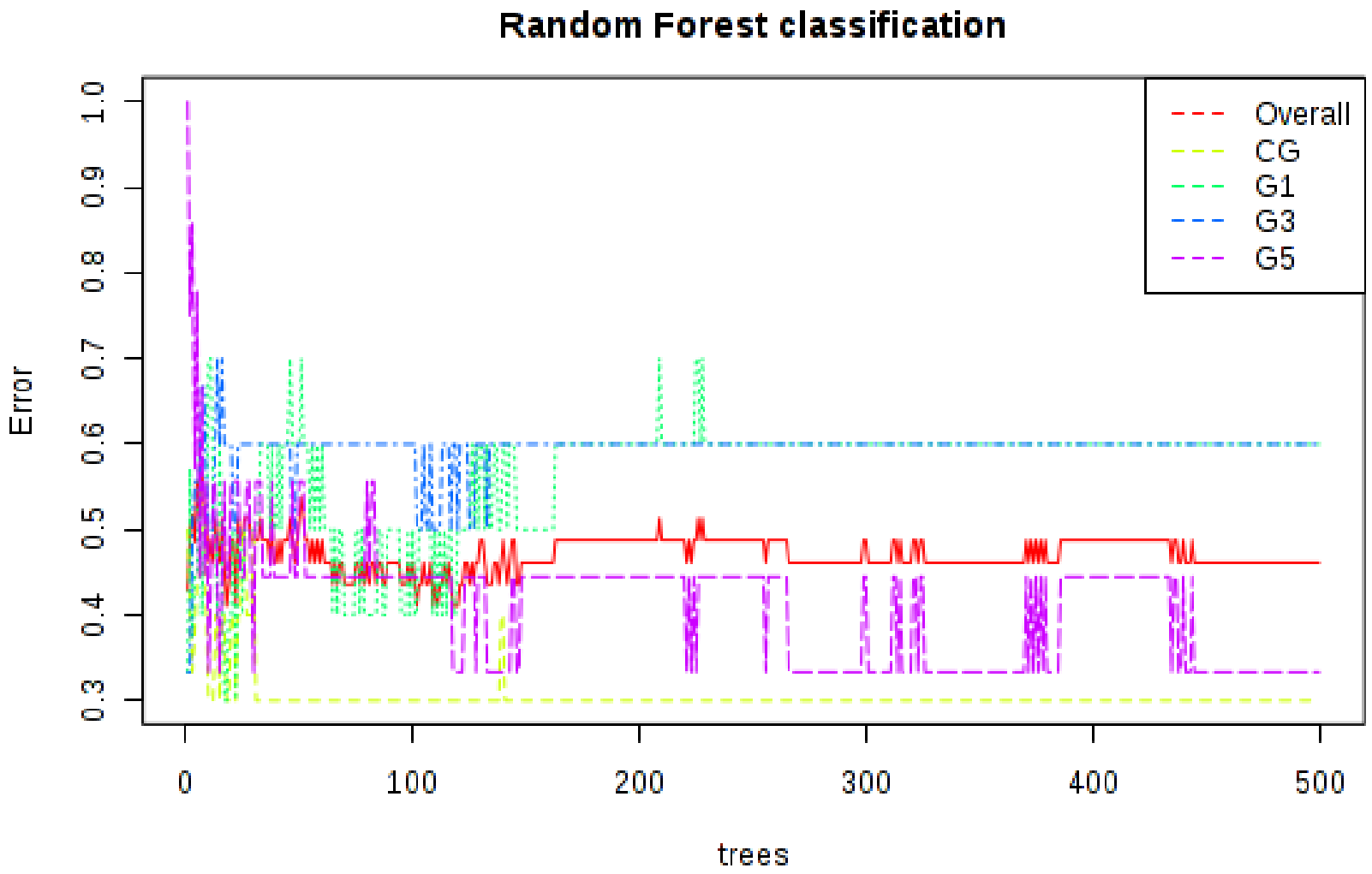
G3 – 1.5mmol/L

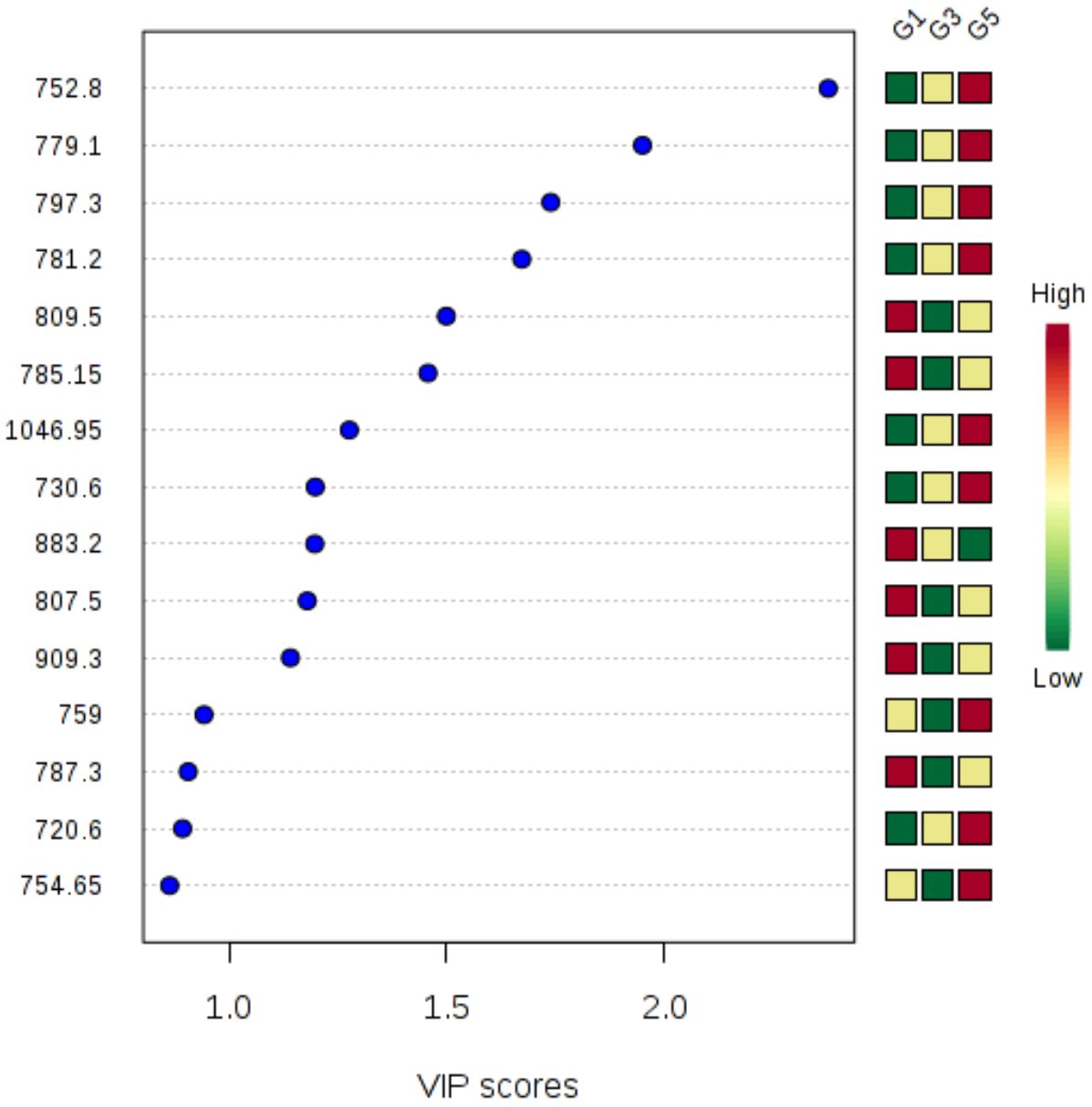

G3_1 0:E1 MS Raw
723.5
739.7
759.0
781.2
809.5
1047.0
G3_2 0:E3 MS Raw
723.5
741.1
781.2
809.5
915.1
1046.9
G3_3 0:E5 MS Raw
732.7
754.9
781.2
809.5
902.6
1047.0
G3_4 0:E7 MS Raw
723.4
741.1
758.9
781.1
809.4
1046.9
1131.0
G3_5 0:E9 MS Raw
732.6
754.9
771.0
809.5
828.8
857.1
883.3
911.5
1009.9
1046.9
G3_6 0:E13 MS Raw
723.5
741.1
781.2
771.0
809.5
828.8
855.0
883.2
1046.9
G3_7x 0:E13 MS Raw
723.5
741.1
781.2
771.0
809.5
828.8
855.0
883.2
1046.9
G3_8 0:E15 MS Raw
732.6
754.9
781.2
809.5
881.1
902.6
997.9
1047.0
1130.2
1174.3
G3_9 0:E15 MS Raw
732.6
754.8
781.1
807.4
828.7
855.0
881.2
907.4
931.4
1046.8
G3_10 0:E17 MS Raw
723.6
741.3
759.1
781.3
809.6
831.8
1047.1
Intens. [a.u.]
m/z
700
750
800
850
900
950
1000
1050
1100
1150

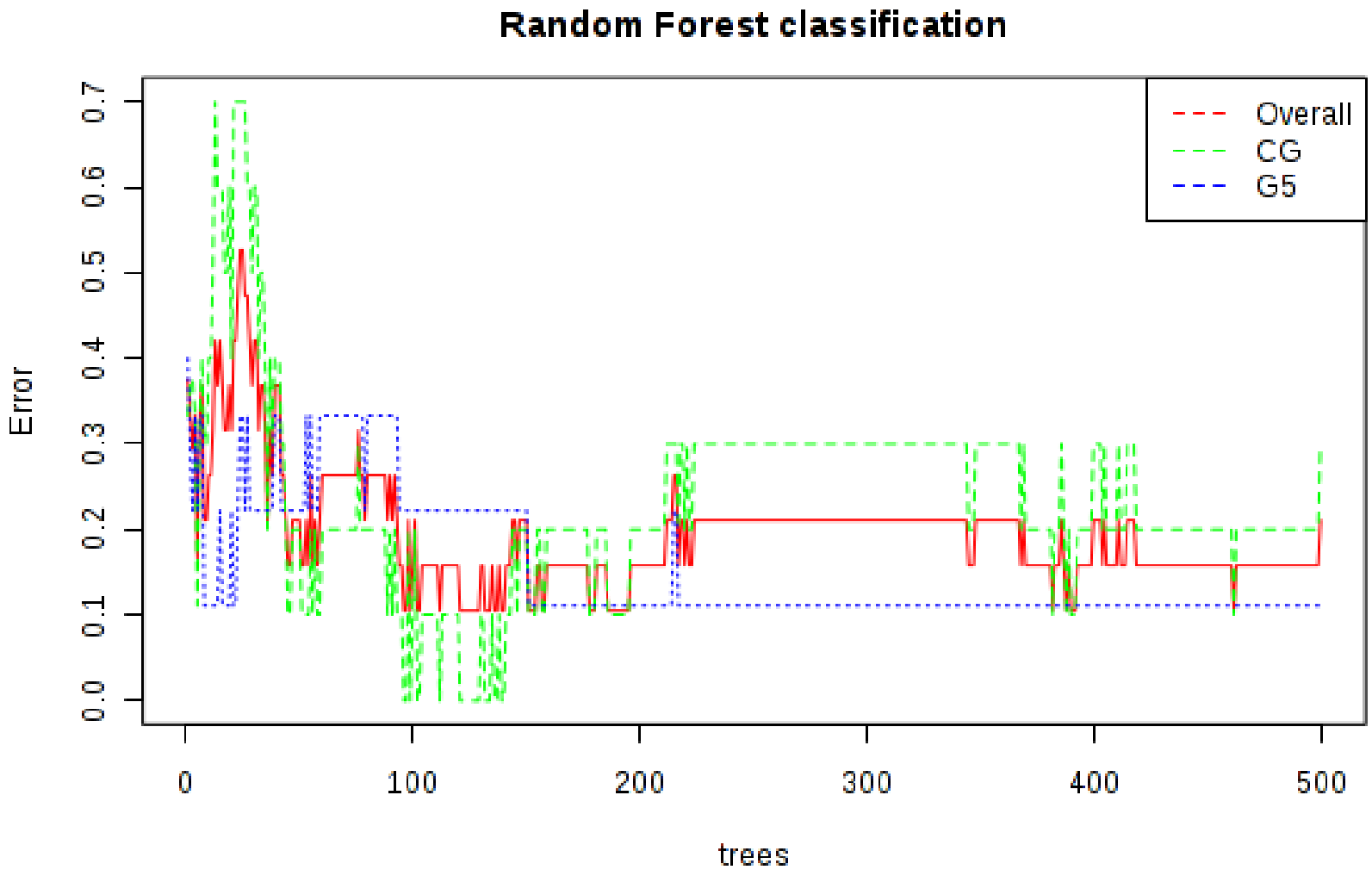
G5 – 2.0mmol/L

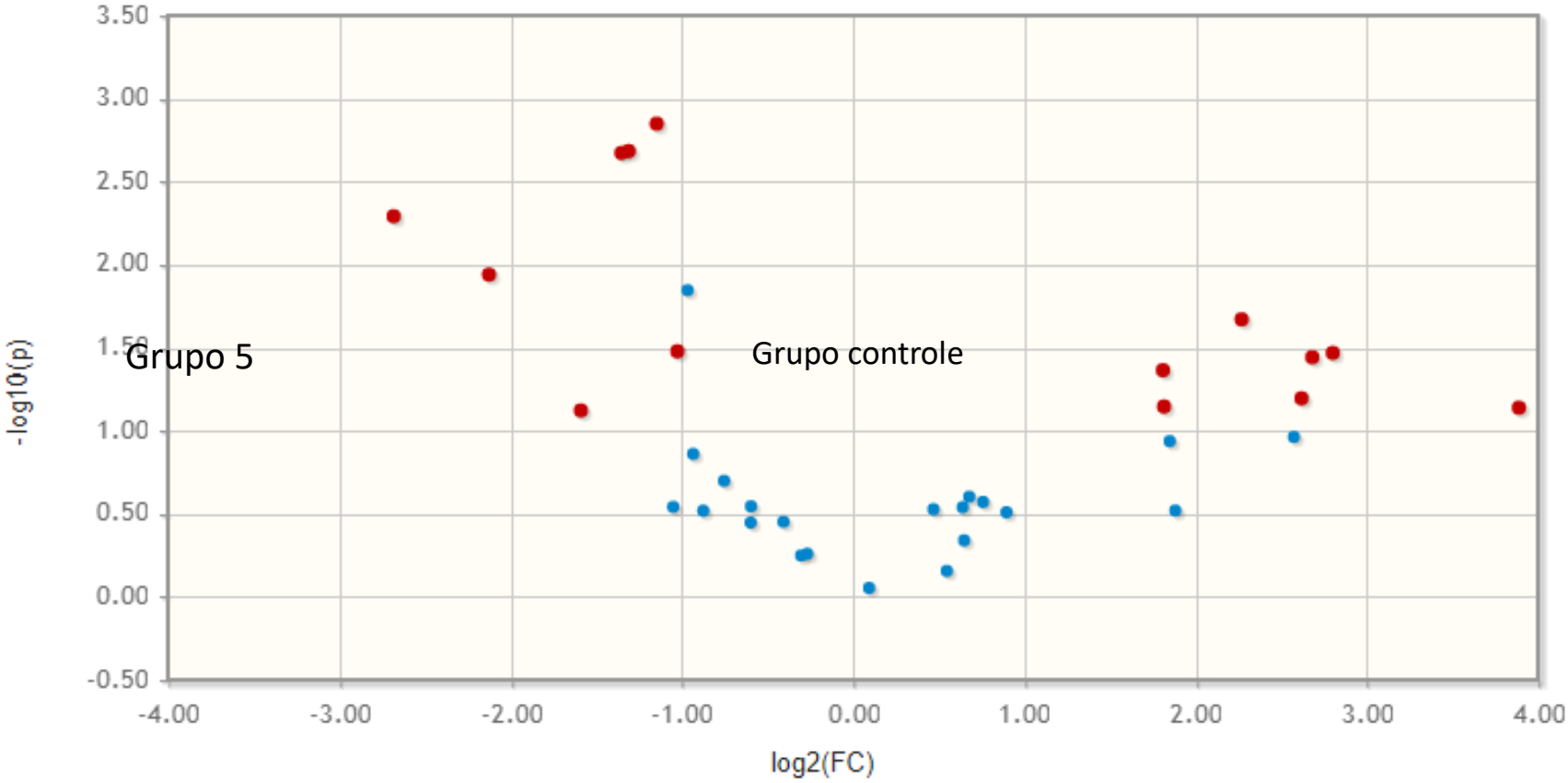

G5_1 0:G1 MS Raw
723.4 741.3 759.0 781.3 809.6 855.1 883.2 902.7 1047.0 1131.1
G5_2 0:G3 MS Raw
723.4 759.0 781.2 809.5 882.8 909.3 1046.9 1131.0
G5_3 0:G5 MS Raw
723.5 741.2 759.0 771.6 781.2 809.5 902.6 1047.0
G5_4 0:G7 MS Raw
732.7 759.0 781.2 809.5 828.8 857.1 883.2 1047.0 1131.1
G5_5 0:G9 MS Raw
723.6 759.1 771.7 781.3 809.6 1047.1
G5_6 0:G11 MS Raw
732.7 759.1 781.3 809.6 1047.1 1130.6
G5_7 0:G13 MS Raw
723.3 740.9 758.8 781.0 809.3 831.5 854.8 883.0 909.2 958.2 1046.6
G5_8 0:G15 MS Raw
723.6 741.2 759.0 771.1 781.3 809.6 839.4 1047.0 1131.2
G5_9 0:G17 MS Raw
732.6 754.8 781.1 809.4 902.5 923.7 1046.9 1131.0
Intens. [a.u.]
m/z
700 750 800 850 900 950 1000 1050 1100 1150


CG
G1
G3
G5
797.3
781.2
811.4
779.1
823.5
766.9
785.15
795.2
720.4
754.65
739.6
759
720.6
809.5
807.5
High
Low
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
VIP scores


Random Forest classification
Error
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1.0
0
100
200
300
400
500
trees
Overall
CG
G1
G3
G5


G1
G3
G5
752.8
779.1
797.3
781.2
809.5
785.15
1046.95
730.6
883.2
807.5
909.3
759
787.3
720.6
754.65
High
Low
1.0
1.5
2.0
VIP scores


Random Forest classification
Error
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0
100
200
300
400
500
trees
Overall
CG
G5


Grupo 5
Grupo controle
-log10(p)
log2(FC)
3.50
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
-0.50
-4.00
-3.00
-2.00
-1.00
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00