RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/06/2021.

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.

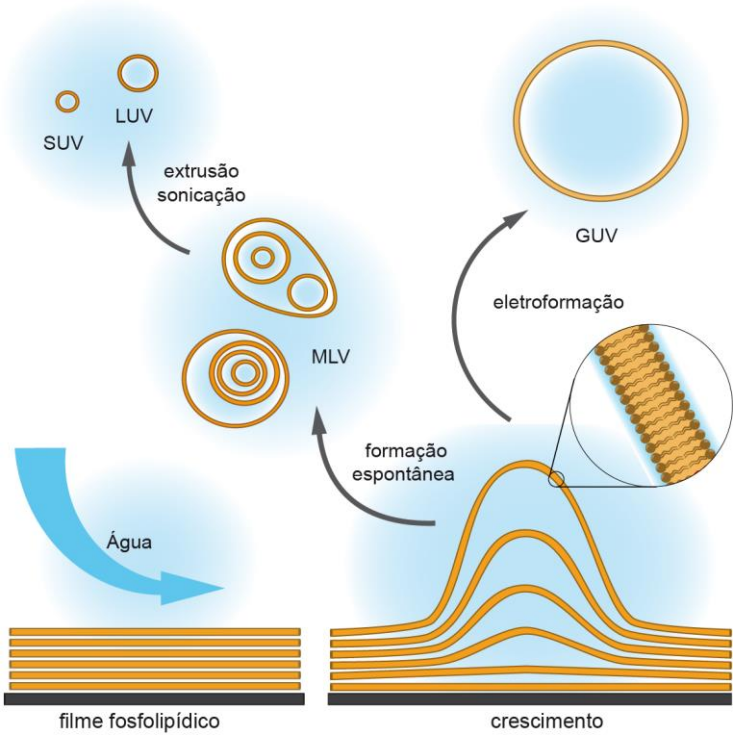


Figura 1. Representação esquemática dos mecanismos de formação de vesículas lipídicas. MLV (multilamellar vesicles), LUV (large unilamellar vesicles), SUV (small unilamellar vesicles) GUV (giant unilamellar vesicles). *Adaptado* de LASIC (1988).

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.

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.