

EFEITO DA AUSÊNCIA DO SFB SOBRE CONTEÚDO LIPÍDICO E PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS

Andressa Minozzo Oliveira¹

Janine de Camargo²

Mateus José Sudano³

Resumo:

A produção in vitro (PIV) de embriões é uma ferramenta que viabiliza o aumento de produtividade, de animais com genética diferenciada na cadeia produtiva. Um grande obstáculo para disseminação dessa tecnologia é a grande sensibilidade dos embriões PIV à criopreservação, quando comparado a embriões produzidos in vivo. Essa criotolerância reduzida está associada ao alto conteúdo lipídico presente no citoplasma desses embriões. Não se sabe por que o acúmulo ocorreu no citoplasma da célula embrionária, no entanto, especula-se que a suplementação com soro fetal bovino (SFB) no meio de cultura seja uma possível causa. O objetivo desse trabalho foi analisar o efeito da remoção do SFB na produção embrionária e no conteúdo lipídico de embriões PIV de maneira a auxiliar na compreensão dos efeitos desse componente na qualidade dos embriões e criotolerância. Os ovários recuperados de abatedouro foram utilizados para a obtenção dos oócitos que foram submetidos à maturação in vitro (MIV) e fertilização in vitro (FIV). Decorridas às 18h de FIV, os possíveis zigotos foram desnudados e distribuídos em dois grupos: grupo cultivado em meio mSOF livre de SFB e grupo controle cultivado com meio mSOF acrescido de 2,5% de SFB. Os zigotos foram cultivados em gotas de 90µL cobertos com óleo mineral em estufa com umidade saturada e atmosfera de 5% de CO₂, 5% O₂ e balanço de N₂. Nos dias 7 e 8 de cultivo, os blastocistos foram coletados aleatoriamente (n=15 mSOF livre de SFB e n=15 mSOF+2,5% de SFB) para a avaliação. Foram corados pelo protocolo da coloração Sudan Black B e realizado a captura das imagens e posterior análise de mensuração do conteúdo lipídico em escalas de cinza através do programa Image J. Para a análise estatística dos dados foram submetidos ao test t com auxílio do software GraphPad Prism 5.0. Em nosso estudo, a remoção do SFB aumentou as taxas de clivagem em embriões cultivados em meio livre de soro. Contudo a produção de blastocistos clivados nos embriões cultivados em meio convencional com SFB foi superior. A presença do SFB no meio de cultivo embrionário vem sendo associada com o aumento do conteúdo lipídico em embriões PIV, influenciando diretamente na qualidade de produção e criotolerância dos embriões. Contudo em nosso estudo o conteúdo lipídico embrionário foi similar entre os grupos. Estudos que viabilizem a compreensão da interferência do meio ao metabolismo embrionário são necessários para que se possa viabilizar uma melhor utilização dos componentes empregados.

Palavras-chave: produção in vitro, embriões bovinos, soro fetal bovino, criotolerância

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

EFEITO DA AUSÊNCIA DO SFB SOBRE CONTEÚDO LIPÍDICO E PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS

¹ Aluno de graduação. andminozzo@gmail.com. Autor principal

² Mestranda. janinedecamargo@gmail.com. Co-autor

³ Docente. mjsudano@gmail.com. Orientador

EFEITO DA AUSÊNCIA DO SORO FETAL BOVINO SOBRE CONTEÚDO LIPÍDICO E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma ferramenta que viabiliza o aumento de produtividade, pois possibilita a produção em larga escala, de animais com genética diferenciada na cadeia produtiva (VIANA et al., 2012). Atualmente, a PIV é aplicada comercialmente com sucesso em bovinos. No entanto, um grande obstáculo para a disseminação dessa tecnologia é a grande sensibilidade dos embriões de PIV à criopreservação, quando comparado a embriões produzidos *in vivo*. Cabe destacar que essa criotolerância reduzida tem sido associada ao alto conteúdo lipídico presente no citoplasma desses embriões (ABE et al., 2002; MUCCI et al., 2006).

Como e porque o acúmulo de lipídios ocorreu no citoplasma das células embrionária de embriões PIV é desconhecido; no entanto, especula-se que o acúmulo ocorre em decorrência da suplementação com soro fetal bovino (SFB) no meio de cultura (ABE et al., 2002; BARCELÓ, 2007), ou devido a anormalidades no metabolismo energético (BARCELÓ, 2007; DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006; RIEGER D, 1992).

O soro fornece substratos energéticos, aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento e quelantes de metais pesados; no entanto, a presença e a concentração desses componentes podem variar entre os lotes (MUCCI et al., 2006). Embora o SFB tenha propriedades úteis, seu uso tem sido associado à síndrome da prole grande (LAZZARI et al., 2002) e várias outras anormalidades, como modificações de organelas celulares (ABE et al., 2002), degeneração mitocondrial (DONALD et al., 1994), formação prematura da blastocle e modificação do perfil de expressão gênica (RIZOS et al., 2002, 2003). Além disso, o SFB pode ser uma fonte de vírus patogênicos (BARCELÓ, 2007), levando a desvios metabólicos, acúmulo excessivo de lipídios (ABE et al., 2007; MUCCI et al., 2006; BARCELÓ, 2007) e menor viabilidade embrionária após a criopreservação (ABE et al., 2007; RIZOS et al. 2002; MUCCI et al., 2006).

Em contraste, o acúmulo de lipídios nos embriões também pode ser causado pelo metabolismo energético alterado. Em embriões de PIV pré e pós-compactação, o metabolismo da glicose foi caracterizado pelo efeito Crabtree (GARDNER et al., 2000), proposto por Bavister (1995) como sendo causado por um excesso do metabolismo da glicose via glicólise, com inibição da fosforilação oxidativa. O acúmulo de lipídios é um efeito do excesso de glicólise causado pelo aumento das concentrações celulares dos precursores da síntese de lipídios (RIEGER, 1992). Um desequilíbrio no processo de oxidação-redução celular também ocorreu, afetando o metabolismo mitocondrial e prejudicando o metabolismo dos complexos lipídicos através da β -oxidação (ABE et al., 2007; BARCELÓ, 2007; DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006; DONALD et al., 1994).

Com intuito de esclarecer os efeitos do soro fetal bovino, o objetivo desse trabalho foi analisar o efeito da remoção do SFB na produção embrionária e no conteúdo lipídico no citoplasma de embriões de maneira a auxiliar na compreensão dos efeitos desse componente de cultivo na qualidade dos embriões produzidos *in vitro* e em sua criotolerância.

2. METODOLOGIA

Produção *in vitro* de embriões

Os ovários recuperados de abatedouro foram utilizados para a obtenção dos oócitos que foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) por 24h e fertilização *in vitro* (FIV) segundo

Sudano et al., 2011; 2012b; 2012c. Decorridas às 18h de FIV, os possíveis zigotos foram desnudados e distribuídos em dois grupos: grupo cultivado em meio mSOF livre de SFB e grupo controle cultivado com meio mSOF acrescido de 2,5% de SFB (Sudano et al., 2011; 2012b; 2012c). Os zigotos foram cultivados em gotas de 90µL (20-30 estruturas/gota) cobertos com óleo mineral em estufa com umidade saturada e atmosfera de 5% de CO₂, 5% O₂ e balanço de N₂.

Quantificação lipídica embrionária

Nos dias 7 e 8 de cultivo, os blastocistos foram coletados aleatoriamente (n=15 mSOF livre de SFB e n=15 mSOF+2,5% de SFB) e submetidos à técnica de coloração de Sudan Black B para a avaliação de conteúdo lipídico. Resumidamente, os embriões foram fixados em solução de formalina 10% em PBS por 2h em temperatura ambiente, foram lavados com água destilada ou PBS com 0,05% PVA, posteriormente lavados novamente em etanol 50% em água e corados com Sudan Black B 1% em etanol 70% durante 2 min. Após incubação, os embriões foram repetidamente lavados em 3 gotas de etanol 50% por 5 min por gota e em 5 gotas de PVA 0,05% por 5 min. Para avaliação os embriões foram montados em lâminas com gota de glicerol cobertas com lamínula e observados em microscópio.

Após submetidos ao protocolo de Sudan Black B foi realizado a captura das imagens e posterior análise de mensuração do conteúdo lipídico em escalas de cinza através do programa Image J.

Análise estatística

As médias dos grupos foram comparadas pelo test t com auxílio do software GraphPad Prism 5.0. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão. Foi adotado nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aprimoramento dos sistemas envolvidos no processo de produção *in vitro* de embriões bovinos a partir de oócitos recuperados de ovários provenientes de abatedouro, tem sido fundamental para o estudo e compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento embrionário (NAGAI, 2001). O uso do soro fetal bovino no meio de cultivo, apesar de apresentar alguns efeitos positivos sobre o desenvolvimento embrionário, deve ser analisado devido aos potenciais efeitos deletérios às estruturas e ao potencial acúmulo excessivo de lipídios, o qual é associado à baixa tolerância à criopreservação (FARIN et al., 2001; ABE et al., 2002; BARCELÓ, 2007).

Em nosso estudo, a remoção do SFB aumentou ($P<0,05$) as taxas de clivagem em embriões cultivados em meio livre de soro (77,3%) em comparação aos cultivados em meio convencional com a suplementação de SFB (70,7%). Contudo a produção de blastocistos clivados nos embriões cultivados em meio convencional com SFB foi superior ($P<0,05$) (43,9%) quando comparada ao grupo de embriões cultivados em meio livre de soro (35,8%). Esse achado vem de encontro a outros relatos que descrevem o efeito bifásico da presença do soro, inibindo as primeiras divisões na clivagem e posteriormente acelerando o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (RIZOS et al., 2002; ENRIGHT et al., 2000).

A presença do SFB no meio de cultivo embrionário vem sendo associada com o aumento do conteúdo lipídico em embriões PIV e dessa maneira influencia, diretamente na qualidade de produção e criotolerância dos embriões produzidos nesses sistemas (ABE et al., 2002; RIZOS et al., 2002; 2003). A presença de grandes quantidades de gotas lipídicas em embriões PIV em meios suplementados com soro, provavelmente prejudica os mecanismos celulares responsáveis pelo reparo da membrana plasmática após a criopreservação. A adição

do soro pode promover a incorporação de ácidos graxos na membrana plasmática alterando sua composição e potencialmente, a tornando mais rígida e incapaz de resistir à criopreservação (MUCCI et al., 2006). Contudo em nosso estudo o conteúdo lipídico embrionário foi similar ($P>0,05$) entre os grupos.

A utilização de meios quimicamente definidos, sem a adição do SFB ou BSA, é uma alternativa para a PIV de embriões bovinos visando à retirada de produtos de origem animal do meio de cultivo e o aumento da sobrevivência embrionária após a vitrificação (BRACKETT, 1996). Barceló- Fimbres e Seidel Jr (2007) demonstraram que também é possível a PIV de embriões bovinos na ausência de SFB sem afetar a produção ou qualidade dos blastocistos, assim como foi observado por Mucci et al. (2006), em que embriões bovinos cultivados na ausência de soro tiveram melhores taxas de sobrevivência embrionária após a vitrificação.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de o conteúdo lipídico total ter sido semelhante entre os dois grupos, é possível que haja uma variação qualitativa entre os mesmos. Além disso, mesmo havendo uma superior taxa de blastocistos clivados no grupo livre de SFB, os resultados do trabalho mostram que o componente de cultivo pode ser deletério em fases iniciais de clivagem, entretanto proporciona um melhor desenvolvimento de blastocistos após as clivagens.

Estudos que viabilizem a compreensão da interferência do meio de cultivo ao metabolismo embrionário são necessários para que se possa viabilizar uma melhor utilização dos componentes energéticos empregados. Além disso essas abordagens permitem o avanço da tecnologia de criopreservação embrionária possibilitando uma expansão comercial mais acentuada.

5. REFERÊNCIAS

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

BARCELÓ-FIMBRES M, SEIDEL JR, GE. Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation in vitro. **Mol Reprod Dev** 2007;74:1406–18.

BARCELÓ-FIMBRES M, SEIDEL JR, GE. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embryonic development alter cryopreservation. **Mol Reprod Dev** 2007;74:1395– 405.

BAVISTER BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artefacts. **Hum Reprod Update** 1995;1:91–148.

BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F.; DRESSSEL, M.A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biol. Reprod**, v. 27, p. 147–158, 1982.

DE LA TORRE-SANCHEZ JF, PRIEIS K, SEIDEL JR, GE. Metabolic regulation of in vitro bovine embryos. I. Effect of metabolic regulators at different glucose concentrations with embryos produced by semen from different bulls. **Reprod Fertil Develop** 2006;18:585–96.

DORLAND M, GARDNER DK, TROUNSON AO. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. **Reprod Fertil Develop** 1994;13:70.

ENRIGHT, B.P.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; WARD, F.A.; YANG, X.; BOLAND, M.P. Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro versus in vivo: Implications for early embryo development and quality. **Theriogenology**, v. 54, p. 659–673, 2000.

FARIN, P.W.; CROISER, A.E.; FARIN C.E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v.55, p.151–170, 2001.

GARDNER DK, POOL TB, LANE M. Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation and viability. *Semin Reprod Med* 2000;18:205–18.

LAZZARI G, WRENZYCKI C, HERRMANN D, DUCHI R, KRUIP T, NIEMANN H, GALLI C. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro produced embryos are related to the large offspring syndrome. **Biol Reprod** 2002;67:767–75.

MUCCI N, ALLER J, KAISER GG, HOZBOR F, CABODEVILA J, ALBERIO RH. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology** 2006;65:1551– 62.

NAGAI, T. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v.55, p.1291–1301, 2001.

RIEGER D. Relationship between energy metabolism and development of the early embryo. **Theriogenology** 1992;37:75–93.

RIZOS D, GUTIERREZ-ADAN A, PEREZ-GARNELO S, DE LA FUENTE J, BOLAND MP, LONERGAN P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implication for blastocysts development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biol Reprod** 2003;68:236–43.

RIZOS D, WARD F, DUFFY P, BOLAND MP, LONERGAN 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* 2002;61: 234–8.

SUDANO MJ, PASCHOAL DM, RASCADO TD, MAGALHAES LCO, CROCOMO LF, LIMA-NETO JF, LANDIM-ALVARENGA FD. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*, v.75 p.1211–1220, 2011.

VIANA, J.H.; SIQUEIRA, L.G.; PALHAO, M.; CAMARGO, L.S. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. *Animal Reproduction*, v.9, p.12–18, 2012.