

Marcadores da fertilização

Novas técnicas mapeiam a função de proteínas, carboidratos e lipídeos para obtenção de embriões bovinos de melhor qualidade

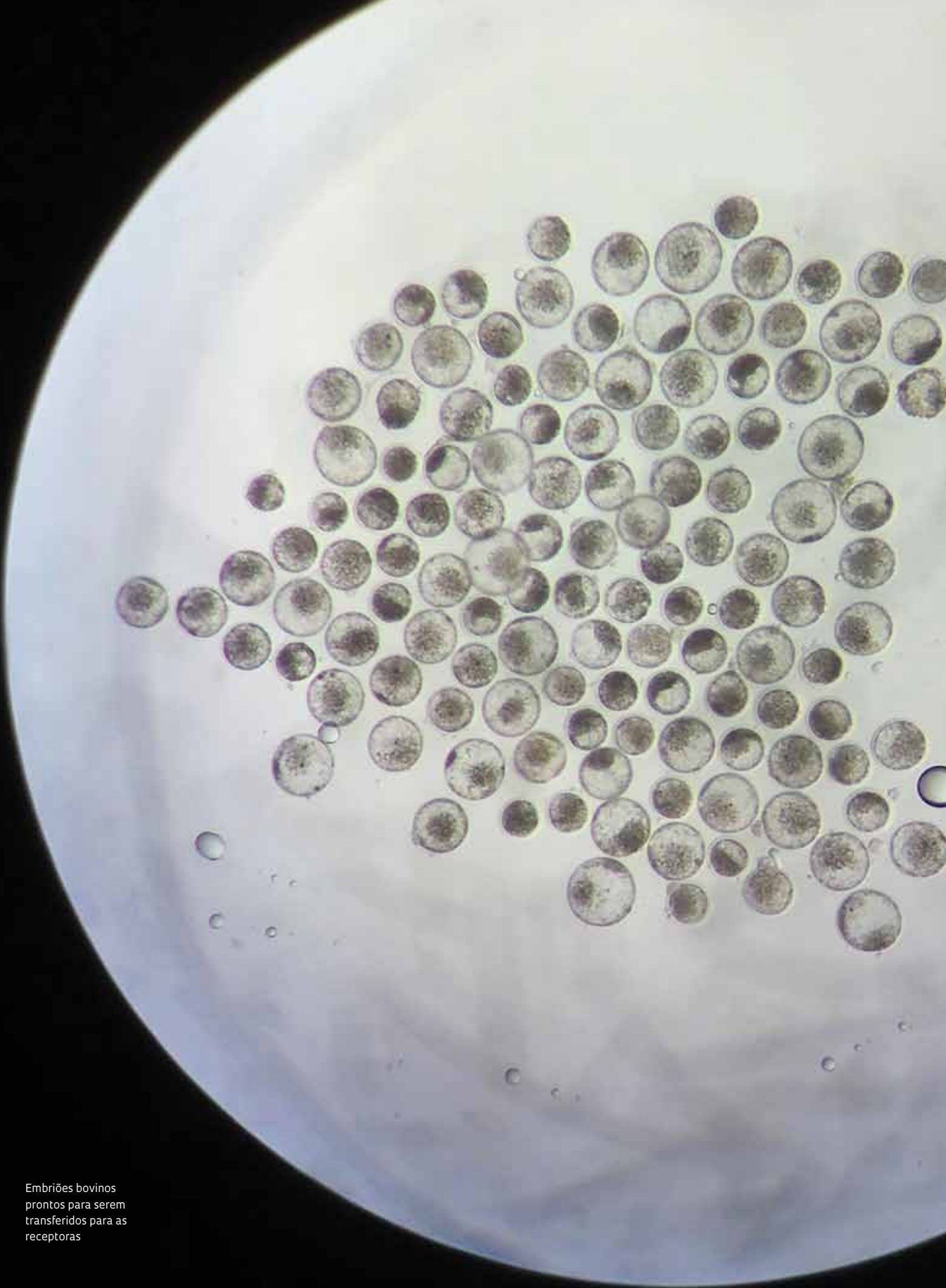
Dinorah Ereno

Quatro grupos de pesquisadores paulistas dedicam-se a mapear e a relacionar a função de marcadores moleculares como lipídeos, proteínas e carboidratos com o auxílio de técnicas de análise não invasivas, que utilizam lasers e espectrômetros, para selecionar na fertilização *in vitro* (em laboratório) os melhores embriões bovinos. O objetivo é garantir o sucesso de gestação ao transferi-los para o útero da vaca. Embora o Brasil detenha atualmente o primeiro posto na produção mundial *in vitro* – com 366.517 embriões bovinos produzidos em 2013, correspondentes a 70% do total –, há muito a melhorar, porque as perdas estão entre 20% e 60%. A variação nessas taxas deve-se, entre outros fatores, à qualidade do embrião e à receptividade do endométrio, a membrana que reveste o útero.

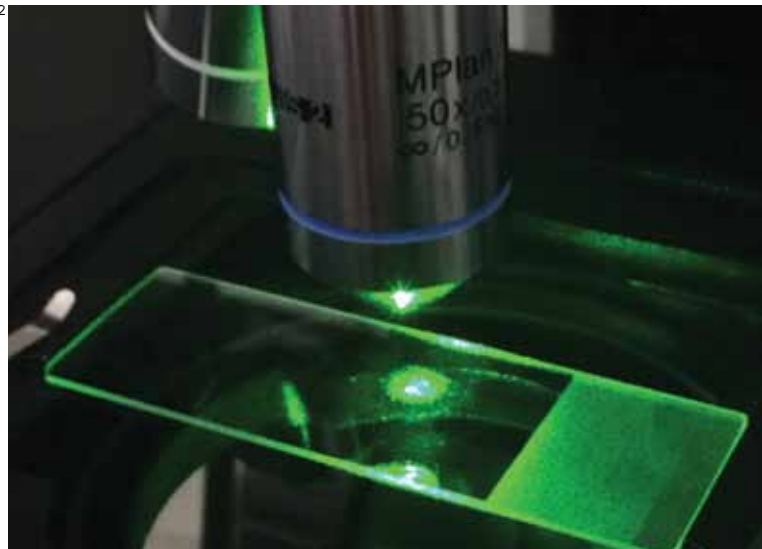
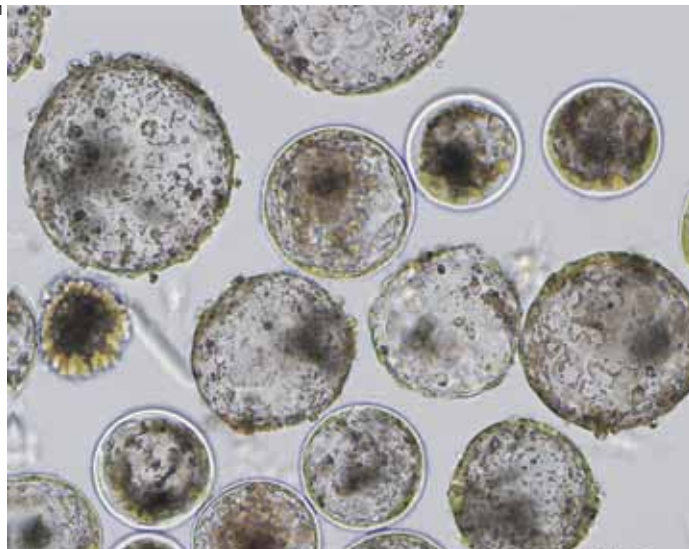
O avanço de técnicas rápidas, menos invasivas e a custo factível na análise e seleção de embriões poderá ajudar nos procedimentos biotecnológicos da reprodução tanto em animais como em humanos, no futuro. Um método inovador, que une a produção de imagens ao mapeamento quí-

mico de marcadores moleculares presentes em óvulos e embriões por meio da técnica de espectrometria de massas, desenvolvido em parceria por pesquisadores da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e da Universidade de São Paulo (USP), poderá representar um avanço significativo nas biotecnologias da reprodução. “Com o uso dessa ferramenta analítica é possível visualizar partes específicas do embrião bovino, como a zona pelúcida, que reveste todo o embrião e é responsável por sua ligação com o útero”, explica o professor Rodrigo Catharino, coordenador das pesquisas e do Laboratório Innovare de Biomarcadores, vinculado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unicamp. A presença de biomarcadores como os lipídeos, que funcionam como indicadores de processos biológicos, pode melhorar essa ligação, resultando em prenhez com mais chance de sucesso. Na fertilização *in vitro*, os óvulos coletados de uma vaca doadora são maturados e fecundados no laboratório. Após a fecundação, os possíveis zigotos – células diploides formadas pela fusão do óvulo com o espermatozoide – permanecem em incubadora para se





Embrões bovinos
prontos para serem
transferidos para as
receptoras



1 e 2 Embriões bovinos em fase de blastocisto e sistema de avaliação por espectroscopia Raman

3 Análise de embrião pela técnica MALDI

desenvolver por sete dias, quando são congelados ou transferidos para uma vaca receptora.

As pesquisas resultaram em dois artigos científicos. No primeiro deles, publicado na *Analytica Chimica Acta*, os autores descrevem o uso da espectrometria de massas na modalidade MALDI para visualizar as diversas zonas que compõem o embrião bovino. Na MALDI, uma matriz – geralmente um ácido orgânico capaz de absorver a luz – é aplicada sobre a amostra e, em seguida, são feitos disparos de feixes de *laser*, que resultam na formação de íons (átomos com perda de elétrons). As moléculas ionizadas entram em um tubo submetido a vácuo (analisador) e são levadas até um detector. Os íons com tamanho menor passam mais rapidamente pelo tubo do que os maiores. Dessa forma, as substâncias das amostras formam espectros, cada um com massa diferente.

“A reunião dos pontos e a informação de qual molécula faz parte do espectro de massas permitem saber qual biomarcador é mais prevalente em cada local da amostra”, diz Catharino. “Conseguimos ver as estruturas separadamente, e não apenas o corpo do embrião e do oócito [célula sexual produzida nos ovários dos animais], como se vê pelas técnicas clássicas de análise.” Ele ressalta que a possibilidade de saber a exata localização de um marcador químico configura uma inovação. “Muitos marcadores descritos nos trabalhos são inéditos, o que significa que ainda é preci-

A possibilidade de saber a exata localização de cada marcador químico configura uma inovação

so muita pesquisa para descobrir o que eles representam no processo de produção de embriões *in vitro*.”

O segundo artigo, publicado na revista *Reproduction, Fertility and Development*, descreve o uso do espectrômetro MALDI para investigar a evolução de lipídeos biomarcadores em óvulos bovinos e em embriões de até oito células e blastocistos, estruturas esféricas formadas em um estágio mais avançado do desenvolvimento embrionário. “Foi possível diferenciar quimicamente os lipídeos em cada fase do embrião porque eles funcionam como assinaturas químicas dos estágios de desenvolvimento.” Participaram dos desenvolvimentos pesquisadores do Innovare, a pesquisadora Roseli Gonçalves e o

professor José Visintin, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da USP, além de Peter Bols, da Universidade da Antuérpia, na Bélgica, Gary Killian, da Universidade Estadual da Pensilvânia, nos Estados Unidos, e o médico veterinário Marcos Achilles, da empresa Achilles Genetics, de Garça, no interior paulista.

Roseli, da USP, que desenvolve um projeto de pesquisa no programa Jovens Pesquisadores em Centros Emergentes da FAPESP, diz que o processo de fecundação ainda não está totalmente definido, por isso a importância dos resultados obtidos nas pesquisas. Durante o seu doutorado, feito na FMVZ da USP com bolsa da FAPESP, ela estudou no John Almquist Research Center, na Universidade Estadual da Pensilvânia, onde trabalhou com marcadores de fertilidade sob orientação de Gary Killian. Ao terminar o doutorado, participou de um projeto coordenado por Killian, que resultou no isolamento de uma



proteína chamada osteopontina, presente em maior quantidade em touros de raças leiteiras com alta fertilidade. “Vimos o efeito dessa proteína na produção *in vitro* de embriões bovinos e no congelamento de sêmen”, diz Roseli, que trabalhou nesse projeto até o fim de 2004.

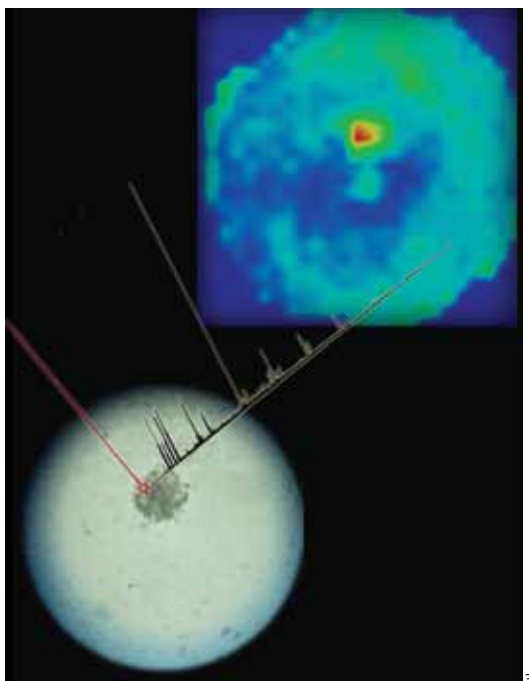
Na Universidade Federal do ABC (UFABC), *campus* de Santo André, na Região Metropolitana de São Paulo, a professora Marcella Pecora Milazzotto está desde 2010 à frente de pesquisas com embriões bovinos em colaboração com Herculano da Silva Martinho, físico de formação. O primeiro projeto teve como objetivo avaliar a interação da luz de um *laser* de baixa intensidade com materiais biológicos. “Usamos o *laser* para estimular espermatozoides, oócitos e embriões bovinos e tivemos resultados interessantes com o gameta feminino [células reprodutoras]”, diz Marcella. “Conseguimos ativar vias importantes de sinalização dentro das células no processo de amadurecimento desse gameta. Percebemos que a luz influencia tanto a produção como a ativação de proteínas presentes nesses oócitos.”

Além desse projeto, o grupo também trabalha com análises por espectroscopia Raman, que utiliza um feixe de luz para colher informação química e estrutural de material biológico. Em uma das pesquisas realizadas o objetivo era descobrir o que faltava aos embriões de laboratório para que se assemelhassem aos do campo. Para isso foram feitas comparações. “Usamos as mesmas técnicas utilizadas na reprodução humana, como morfologia embrionária, avaliação da velocidade do embrião em se desenvolver dentro do laboratório e análise por espectroscopia Raman dos

embriões do laboratório e produzidos em campo”, relata Marcella. E todos os dados de espectroscopia foram comparados com os de metabolismo energético, de gordura e estresse para tentar selecionar os mais viáveis. A descoberta levou a um depósito de patente feito pela universidade.

Na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (Unesp) de Botucatu, Fernanda da Cruz Landim, do departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, coordena projetos de pesquisa com o intuito de obter informações relacionadas à biologia básica dos embriões bovinos para melhorar técnicas importantes destinadas à comercialização do produto, como o aumento da produção embrionária *in vitro* e a criopreservação, que é o congelamento dos embriões excedentes no processo de transferência. Em um dos projetos foi feita a comparação da expressão gênica – processo em que a informação codificada por um gene é decodificada em uma proteína – entre embriões das raças nelore (*Bos taurus indicus*) e simental (*Bos taurus taurus*) produzidos no laboratório e coletados da vaca. “Fizemos um padrão geral da expressão gênica e selecionamos vários genes diferentes envolvidos no metabolismo lipídico”, relata Fernanda.

Para análise das amostras, foi utilizada a espectrometria de massas Maldí. “Quando aplicamos a técnica de Maldí para avaliação do perfil lipídico, com o objetivo de seleção de embriões que poderiam ser mais bem criopreservados, observamos que existe um perfil diferente em relação aos lipídeos da nelore e da simental produzidos *in vivo* e *in vitro*.” Os embriões com as melhores qualidades para resistir ao processo de congelamento foram os da simental produzidos no campo. ■



Projetos

1. Análise do perfil proteico e lipídico de embriões pré-implantacionais bovinos obtidos por fecundação *in vitro*, transferência de embriões e por transferência nuclear de células somáticas pela técnica de espectrometria de massas (nº 2010/01077-9); **Modalidade** Jovens Pesquisadores em Centros Emergentes; **Pesquisadora responsável** Roseli Fernandes (USP); **Investimento** R\$ 629.986,73 (FAPESP).
2. Metabolômica para avaliação não invasiva de embriões bovinos produzidos *in vitro* (nº 2012/10351-2); **Modalidade** Auxílio à Pesquisa – Regular; **Pesquisadora responsável** Marcella Pecora Milazzotto (UFABC); **Investimento** R\$ 174.631,10 (FAPESP).
3. Comparação do padrão da expressão gênica global de embriões *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* produzidos *in vitro* (nº 2010/09922-0); **Modalidade** Auxílio Regular; **Pesquisadora responsável** Fernanda da Cruz Landim (Unesp); **Investimento** R\$ 140.442,19 (FAPESP).

Artigos científicos

GONÇALVES, R. F. *et al.* Analysis and characterisation of bovine oocyte and embryo biomarkers by matrix-assisted desorption/ionisation mass spectrometry imaging. **Reproduction, Fertility and Development**. 11 jul. 2014 (*on-line*).

SUDANO, M. J. *et al.* Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* *in vitro*- and *in vivo*-produced blastocysts. **Biology of Reproduction**. v. 87 (6), p. 130. dez. 2012.