

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS**

FRANCIELE LANZARINI

**EFEITO DO KNOCKDOWN GÊNICO DA *ELOVL5* SOBRE O
DESENVOLVIMENTO E METABOLISMO LIPÍDICO EMBRIONÁRIO**

**Uruguiana
2019**

FRANCIELE LANZARINI

**EFEITO DO KNOCKDOWN GÊNICO DA *ELOVL5* SOBRE O
DESENVOLVIMENTO E METABOLISMO LIPÍDICO EMBRIONÁRIO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mateus José Sudano

**Uruguiana
2019**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

L294e Lanzarini, Franciele

EFEITO DO KNOCKDOWN GÊNICO DA ELOVL5 SOBRE O
DESENVOLVIMENTO E METABOLISMO LIPÍDICO EMBRIONÁRIO / Franciele
Lanzarini.

29 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, 2019.

"Orientação: Mateus José Sudano".

1. ELOVL5. 2. embrião. 3. knockdown. 4. lipídios. 5.
desenvolvimento inicial. I. Título.

FRANCIELE LANZARINI

**EFEITO DO KNOCKDOWN GÊNICO DA *ELOVL5* SOBRE O
DESENVOLVIMENTO E METABOLISMO LIPÍDICO EMBRIONÁRIO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de concentração:
Fisiologia/Ciências Biológicas II –
Linha de Fisiologia Endócrina
(Fisiologia e Biotecnologia da
Reprodução).

Dissertação defendida e aprovada em
Banca examinadora:

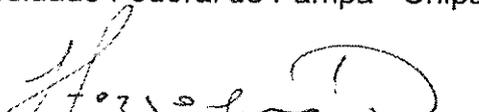


Prof. Dr. Mateus José Sudano
Orientador

Universidade Federal do Pampa - Unipampa



Prof. Dr. Fernando Silveira Mesquita
Universidade Federal do Pampa - Unipampa



Prof. Dr. Fabrício Desconzi Mozzaquatro
Universidade Federal do Pampa - Unipampa

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha colega e amiga Janine de Camargo, que foi meu alicerce e meu porto seguro desde o dia em que nos conhecemos.

AGRADECIMENTO

A minha família, por me apoiar e compreender minha ausência.

Ao meu orientador, Prof. Dr Mateus José Sudano, por ser um brilhante mentor, meu exemplo de cientista. Sempre com as palavras adequadas para todas as situações, quando eu achei que não podia mais seguir, ele me encorajou. Agradeço por sua paciência, e por acreditar no meu potencial. Espero estar a altura para seguir sendo sua orientada nas etapas que seguirão. Muito obrigada.

A minha equipe de trabalho, que mesmo perante o cansaço não se deixou abater, e permaneceu forte e confiante, sendo decisiva para o sucesso deste trabalho. Amo vocês Fernanda, Andressa e Janine.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Genética e Melhoramento Animal da Universidade Federal do Pampa, pelo auxílio em algumas etapas do experimento, pela amizade e pelos momentos bons que passamos. Continuem sendo brilhantes, Andressa, Milena, Gabrielly e Diego.

Aos colegas e professores do Programa Multicêntrico de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa, pela troca de conhecimentos e experiências. Lamento não ter sido tão presente, vocês são pessoas fantásticas.

A Universidade Federal do Pampa, ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade e estrutura para concluir mais essa etapa.

Aos colaboradores do Frigorífico Marfrig, os quais disponibilizaram material para os experimentos;

A todos os amigos que fiz e que foram fundamentais para minha saúde mental, tornando meus dias mais leves.

EPÍGRAFE

“Não importa quão estreita a passagem,
quantas punições ainda sofrerei, sou o
mestre do meu destino, sou o comandante
da minha alma”.

(William Ernest Henley)

RESUMO

EFEITO DO KNOCKDOWN GÊNICO DA *ELOVL5* SOBRE O DESENVOLVIMENTO E METABOLISMO LIPÍDICO EMBRIONÁRIO

AUTORA: Franciele Lanzarini

ORIENTADOR: Prof. Dr. Mateus José Sudano

Uruguaiana – RS

Sabe-se que os lipídios são parte fundamental da célula embrionária, seja para reservas energéticas, funções de sinalização celular, composição de bicamada lipídica, permeabilidade celular, entre outros. A estreita ligação dos lipídios com a baixa criotolerância de embriões produzidos *in vitro*, estimulou grupos de estudo a compreender melhor o papel dos lipídios no embrião, visto que representa um gargalo para a eficiência da técnica de produção. Embora muito tenha sido esclarecido, ainda fica o questionamento de o porquê os embriões com maior acúmulo lipídico refletem uma baixa qualidade e competência. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi estudar o envolvimento da enzima *ELOVL5* (membro da família *ELOVL*, responsável pelo alongamento de lipídios) no metabolismo lipídico e desenvolvimento. Oócitos imaturos (n = 2943) foram recuperados de ovários originados de abatedouro e maturados, fertilizados e cultivados *in vitro* sob condições padrão. A clivagem foi registrada no dia 3 após a fertilização, e os tratamentos dos experimentos I e II foram realizados no dia quatro após a fertilização. O objetivo do Experimento I foi testar a efetividade do ensaio de Morfolino (Mo) e toxicidade das substâncias que compunham os tratamentos em questão que foram administrados em meio de cultura dos embriões. No Experimento I, 345 oócitos foram distribuídos em 3 grupos, o primeiro grupo recebeu um tratamento composto de Mo acoplado a sonda fluorescente mais Endoportador (EP; Mo+EP); o segundo grupo recebeu Mo acoplado a sonda fluorescente sem adição do EP (Mo-EP); e o terceiro grupo recebeu um tratamento composto de PBS (meio de diluição) como Controle. Nos dias 7 e 8 do cultivo, foram coletados os blastocistos expandidos, totalizando 87 estruturas, as quais foram submetidas a análise de fluorescência. O desenvolvimento embrionário, a intensidade de fluorescência e o número total de células foram analisados com ANOVA usando o procedimento de modelo linear misto generalizado (GLIMMIX) com o pacote de

software estatístico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA) após a confirmação de que os dados foram distribuídos normalmente e as variâncias foram homogêneas. O tratamento do Experimento I (Placebo, ensaio Mo, EP), dose do BSA do Experimento I (100 µg/mL vs. 5 mg/mL), e interações de primeira ordem foram considerados efeitos fixos, enquanto as replicações foram consideradas efeitos aleatórios. Se a ANOVA foi significativa, as médias foram analisadas usando o teste de probabilidade de diferenças individuais (PDIF). Os dados são relatados como médias dos mínimos quadrados ± SEMs. Na ausência de interação tratamento*dose do BSA, apenas os efeitos principais foram apresentados. O grupo que recebeu Mo+EP, exibiu a maior ($P<0,05$) intensidade de fluorescência em comparação aos outros grupos. As taxas de produção embrionária foram semelhantes ($P>0,05$) entre os grupos. O objetivo do experimento II foi observar o efeito do bloqueio temporário de ELOVL5 no metabolismo lipídico, onde a quantificação dos lipídeos citoplasmáticos, avaliação dos aumentos e reduções de espécies lipídicas específicas, bem como o efeito sobre o desenvolvimento embrionário inicial foram realizados. No Experimento II, 2.598 oócitos foram divididos em três grupos. O primeiro grupo recebeu Mo específico para ELOVL5 bovino e EP diluído em PBS (ELOVL5Mo); O segundo grupo recebeu Mo específico para o gene humano e não presente em bovino associado ao EP e ao PBS diluído (Controle da técnica); O terceiro grupo recebeu apenas PBS (Controle biológico, definido como Placebo). Os blastocistos expandidos foram coletados e submetidos à preparação das amostras de acordo com as necessidades dos testes analíticos realizados. Na imunolocalização de proteína ($n= 16$ a 25 por grupo), o grupo ELOVL5 Mo apresentou elevada ($P<0,05$) abundância para a proteína ELOVL5 quando comparado aos demais grupos, os quais não diferiram entre si ($P>0,05$). Na análise semi-quantitativa do conteúdo lipídico ($n= 15$ /grupo) foi observada uma elevação marcante ($P<0,05$) da quantidade de gotas lipídicas citoplasmática nos embriões do grupo ELOVL5 Mo comparado aos demais grupos. Adicionalmente, na análise de perfil lipídico ($n= 15$ /grupo) através da espectrometria de massas por ionização/dessorção de matriz assistida a laser (MALDI-MS), foi possível constatar uma individualização dos grupos com pouca sobreposição das amostras na análise discriminante dos quadrados mínimos parciais (PLS-DA) e uma redução ($P<0,05$) na abundância de espécies lipídicas encontradas no grupo ELOVL5 Mo comparada com o grupo Placebo. Especulamos que houve a ocorrência de um possível efeito

compensatório de rebote no grupo ELOVL5 Mo, visto que tanto a proteína como os lipídios citoplasmáticos apresentaram-se elevados, enquanto que a abundância relativa de espécies lipídicas específicas estava reduzida no perfil lipídico dos blastocistos ELOVL5 Mo. Conclui-se que a ELOVL5 está envolvida no metabolismo lipídico de embriões bovinos durante o período de desenvolvimento inicial.

Palavras chave: ELOVL5; embrião; knockdown; lipídios, desenvolvimento inicial.

ABSTRACT

EFFECT OF GENEKNOCKDOWN *ELOVL5* ON EMBRYONIC LIPID DEVELOPMENT AND METABOLISM

AUTHOR: Franciele Lanzarini

ORIENTING PROFESSOR : Prof. Dr. Mateus Jose Sudano

Uruguaiiana - RS, march 14, 2019.

It is known that lipids are a fundamental part of the embryonic cell, either for energy reserves, cell signaling functions, lipid bilayer composition, cell permeability, among others. The close link of lipids with the low cryotolerance of embryos produced in vitro stimulated research groups to better understand the role of lipids in the embryo. Although much information of embryo lipids has been documented, the question remains as to why the embryos with the greater lipid accumulation reflect a poor quality and competence. Thus, the objective of the present study was to study the involvement of ELOVL5 enzyme (member of the ELOVL family, responsible for lipid elongation) in lipid metabolism and development. Immature oocytes (n = 2943) were recovered from ovaries from slaughterhouse and matured, fertilized and cultured in vitro under standard conditions. Cleavage was recorded on day 3 after fertilization, and the treatments of experiments I and II were performed on day four after fertilization. The objective of Experiment I was to test the effectiveness of the Morpholino (Mo) assay and toxicity of the substances composing the treatments in question that were administered in embryo culture medium. In Experiment I, 345 oocytes were distributed in 3 groups, the first group received a treatment consisting of Mo coupled to the fluorescent probe plus Endoportor (EP; Mo + EP); the second group received Mo coupled to the fluorescent probe without EP addition (Mo-EP); and the third group received a treatment consisting of PBS (dilution medium) as Control. On days 7 and 8 of the culture, the expanded blastocysts were collected, totaling 87 structures, which were submitted to fluorescence analysis. The objective of experiment II was to observe the effect of the temporary blockade of ELOVL5 on the lipid metabolism, where the quantification of the cytoplasmatic lipids, evaluation of the increases and reductions of specific lipid species, as well as the effect on the initial embryonic development were performed. In Experiment II, 2,598 oocytes were

divided into three groups. The first group received specific Mo for bovine ELOVL5 and EP diluted in PBS (ELOVL5 Mo); The second group received Mo specific for human gene and not present in bovine associated with EP and diluted PBS (Control of technique); The third group received only PBS (Biological Control, defined as Placebo). The expanded blastocysts were collected and submitted to the preparation of samples according to the needs of the analytical tests performed. Embryonic development, fluorescence intensity and total number of cells were analyzed with ANOVA using the generalized linear mixed-model procedure (GLIMMIX) with the statistical software package SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA) after confirmation that the data were normally distributed and the variances were homogeneous. Treatment (Placebo, Mo Assay, EP), BSA dose (100 mg / mL vs. 5 mg / mL), and first-order interactions were considered fixed effects, while replication was considered random effects. If the ANOVA was significant, the means were analyzed using the Individual Differences Probability (PDIFF) test. Data are reported as means of least squares \pm SEMs. In the absence of interaction treatment * dose of BSA, only the major effects were presented. The group receiving Mo + EP, exhibited the highest ($P < 0.05$) fluorescence intensity compared to the other groups. Embryo production rates were similar ($P > 0.05$) among groups. In the protein immunolocalization ($n = 16$ to 25 per group), the ELOVL5 Mo group presented highest ($P < 0.05$) abundance for the ELOVL5 protein when compared to the other groups, which did not differ among them ($P > 0.05$). In the semi-quantitative analysis of the lipid content ($n = 15$ / group) a marked increase ($P < 0.05$) in the number of cytoplasmic lipid droplets was observed in ELOVL5 Mo embryos compared to the other groups. Additionally, in the lipid profile analysis ($n = 15$ / group) through mass spectrometry by ionization / desorption of laser assisted matrix (MALDI-MS), it was possible to observe an individualization of the groups with little overlap of the samples in the discriminant analysis of the least partial squares (PLS-DA) and a reduction ($P < 0.05$) in the abundance of lipid species found in the ELOVL5 Mo group compared to the Placebo group. We speculated that there was a possible compensatory effect in the ELOVL5 Mo group, since both the protein and the cytoplasmic lipids were elevated, while the relative abundance of specific lipid species was reduced in the lipid profile of ELOVL5 Mo blastocysts. It is concluded that ELOVL5 is involved in the lipid metabolism of bovine embryos during the preimplantation development.

Keywords: ELOVL5; embryo; knockdown; lipids; initial development.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2.	CAPÍTULO I	15
2.1	EMBASAMENTO TEÓRICO.....	15
2.1.1	<i>Competência e viabilidade embrionária</i>	15
2.1.2	<i>Lipídios</i>	17
2.1.3	<i>Elongases de ácidos graxos</i>	18
2.1.4	<i>Knockdown gênico</i>	20
2.2	REFERÊNCIAS.....	21
2.3	OBJETIVOS.....	27
2.3.1	<i>Objetivos gerais</i>	27
2.3.2	<i>Objetivos específicos</i>	27
2.4	HIPÓTESES.....	27
3	CAPÍTULO II	28
3.1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	28
4	CONCLUSÕES	29

1 INTRODUÇÃO

A PIVE (Produção *In Vitro* de Embriões) bovinos iniciou no Brasil na década de 1990 culminando nos primeiros nascimentos de bezerras em meados de 1994 após a aprovação de um projeto de inovação tecnológica financiado pela FAPESP (Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo), e pelas empresas Beabisa Agricultura Ltda e Gertec Tecnologia de Embriões, localizadas no estado de São Paulo. Em 2017, o Brasil registrou a maior produção mundial de embriões, cerca de 280.000 embriões/ano, representando em torno de 62% do total mundial (lets, 2016) Grande parte deste sucesso se deve ao tamanho expressivo do rebanho bovino brasileiro, que conta com cerca de 215 milhões de cabeças, segundo dados da Fao (2017), e à característica do rebanho zebuino predominante, relacionada à alta produção de oócitos por coleta.

Desde o início de sua utilização, a técnica vem sendo constantemente aprimorada, permitindo novas oportunidades para produtores, podendo superar a infertilidade do rebanho e aumentar a disseminação de animais com alto mérito genético, favorecendo ainda a comercialização internacional de embriões. Ainda, pelo fato de o desenvolvimento embrionário inicial de bovinos e outros mamíferos seja semelhante, embriões bovinos podem ser utilizados como sistema modelo para o estudo da embriogênese em diversas espécies, inclusive humanos.

Apesar dos vários estudos acerca da técnica, muitos pontos ainda seguem incompreendidos, como a criopreservação de embriões. Apesar de ser primordial para o avanço da técnica, o processo de criopreservação expõe o embrião a condições extremas, levando a perdas importantes, e, portanto, representando um gargalo significativo para ampla disseminação da técnica de PIVE. Sabe-se que a crioinjúria está intimamente relacionada ao conteúdo lipídico embrionário, carecendo de maiores estudos para compreender o seu papel no organismo embrionário.

Alguns estudos foram essenciais para definir alguns conceitos já bem aceitos pela comunidade científica, como o de Farin *et al.*, (2004), que definiu “A Síndrome da Prole Gigante”, fenômeno observado quando da suplementação de Soro Fetal Bovino (SFB) em meio de cultura; a *teoria* do embrião silencioso de Leese (2002), que descreve que embriões de melhor qualidade são os que apresentam um metabolismo mais lento, geralmente originados de produção *in vivo*, diferentemente dos *in vitro*, que demonstram um metabolismo mais acelerado e menores taxas de sobrevivência.

Sabendo que o acúmulo lipídico em embriões provoca uma baixa fluidez de membrana, representando um impedimento para penetração do crioprotetor no embrião criopreservado, levando à crioinjúria, e elevadas taxas de morte embrionária pós descongelamento, Analisamos as funções dos lipídios para a célula, e nos deparamos uma família de enzimas chamada ELOVL (elongases de ácidos graxos de cadeia muito longa), é composta de 7 membros. Cada um desses membros promovem o alongamento de lipídios específicos em mamíferos, adicionando duas moléculas de carbono ao final da cadeia carbonada de ácidos graxos de cadeia muito longa (Bond *et al.*, 2016). Esse processo faz parte da biosíntese de ácidos graxos, e, portanto, é essencial para o funcionamento homeostático da célula. Segundo Carvalho e Recco-Pimentel (2013), ácidos graxos contendo cadeias carbônicas mais longas conferem menor fluidez para as membranas. Considerando que a enzima irá promover um alongamento adicional em lipídios que já possuem uma cadeia muito longa, elas representam um agravante para a redução da fluidez da membrana do embrião. Desta maneira, observamos que a enzima ELOVL5 é responsável por alongar os lipídios presentes em oócitos bovinos (16 a 20 carbonos), e devido a sua função provocar a redução da fluidez de membrana, tornou-se objeto do presente estudo. Até o momento, nosso grupo foi o primeiro a estudar a relação desta com lipídios de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Deste modo, estudaremos o comportamento dos lipídios embrionários frente ao bloqueio temporário da ELOVL5.

2. CAPÍTULO I

2.1 EMBASAMENTO TEÓRICO

2.1.1 Competência e viabilidade embrionária

De um modo geral, a produção *in vitro* de embriões visa à formação de uma nova progênie a fim de acelerar a expansão de material genético de excelência. Para que este objetivo seja atingido, existem muitas etapas a serem vencidas. Sirard *et al.* (2006) descreve os cinco níveis de competência. Eles representam os principais passos que caracterizam a competência de desenvolvimento, que são: retomada da meiose; clivagem após a fertilização; evolução para o estágio de blastocisto; indução à prenhez e levá-la a termo; desenvolvimento a termo em boa saúde. Ainda ressalta que cada um desses níveis são eventos separados e o sucesso nos primeiros eventos não garante o sucesso dos subsequentes.

É importante destacar que os sistemas de produção de embriões – *in vitro* e *in vivo* - são fatores decisivos sobre a taxa de sobrevivência embrionária. Rizos *et al.* (2002) demonstra que oócitos maturados *in vivo* são mais competentes do que aqueles maturados *in vitro*, e essa afirmação podemos ver refletida nas atuais taxas de produção embrionária de 30% a 40% quando produzidos *in vitro* contra 70% a 80% quando produzidos *in vivo*. Tal diferença é decorrente de múltiplos fatores oriundos da PIVE, que inicia na seleção dos oócitos e se estendem durante todas as etapas de manipulação *in vitro*.

Atualmente, muitos embriologistas definem o embrião de qualidade baseando-se em aspectos morfocinéticos, utilizando estereomicroscópio, e comparando à tabela definida pela International Embryo Technology Society (IETS), que estabelece as fases do desenvolvimento embrionário para sua classificação. Para Farin *et al.* (1999), a avaliação morfológica acontece de forma muito subjetiva e pode variar entre os avaliadores.

Para minimizar essa subjetividade, softwares para avaliação morfológica de blastocistos estão sendo desenvolvidos e aprimorados, onde o programa de computador é abastecido com imagens de blastocistos em diferentes graus, e, por comparação, ele pode classificar os blastocistos semi-automaticamente (Filho *et al.*, 2012) ou automaticamente (Rocha *et al.*, 2017).

Porém, como mencionado anteriormente, a análise morfológica somente não basta. Overström (1996) chama a atenção para integridade de membrana do blastômero, e afirma que se a mesma, que atua como barreira seletiva, estiver comprometida, a homeostase celular é afetada negativamente, levando à rápida morte celular.

Leese (2012) analisa detalhadamente a relação entre o metabolismo embrionário e o seu desenvolvimento, onde cada fase corresponde à utilização maior ou menor de diferentes nutrientes e geração de metabólitos. O autor ainda correlaciona o metabolismo embrionário a sua teoria do “Embrião Silencioso” onde afirma que um embrião viável tende a consumir menores quantidades de nutrientes e, devido o genoma, transcriptoma e proteoma não se apresentam exageradamente comprometidos, são maiores as possibilidades de sustentar o desenvolvimento. Em contrapartida, embriões menos viáveis com maior dano molecular apresentam-se menos capazes de superar situações adversas e, na tentativa de realizar reparos ou

sofrerem processos apoptóticos, tendem a ativar mais o seu metabolismo (Leese, 2002).

Embora muito tenha sido desenvolvido, ainda não existe uma metodologia definitiva para atestar a qualidade embrionária, Há necessidade de desenvolver alternativas que sejam rápidas, não invasivas e objetivas (Overström, 1996). Apesar de ser um método subjetivo, a avaliação morfológica ainda é o método mais utilizado, pois todas as outras metodologias abordadas acabam tornando-se inviáveis, seja por seu alto custo, letalidade embrionária ou pela elevada exigência da técnica.

2.1.2 Lipídios

Os lipídios biológicos são um grupo de compostos químicos diversos. A característica que todos têm em comum é a insolubilidade à água. Suas funções englobam armazenamento de energia, estruturação de membranas, atuação como co-fator enzimático, transporte de elétrons, âncoras hidrofóbicas para proteínas, entre outras funções. Os lipídios de armazenamento são chamados ácidos graxos, que são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas e de comprimento variando entre 4 a 36 carbonos. Essas cadeias podem apresentar uma ou mais ligações duplas, caracterizando a insaturação. Para o ácido oleico, por exemplo, sua nomenclatura simplificada é representada por 18:1 (Δ^9) pois contém 18 carbonos em sua cadeia hidrocarbonada, e uma ligação dupla entre os carbonos C9 e C10. O ácido graxo pode ainda não conter nenhuma ligação dupla, caracterizando a saturação, como é o caso do ácido palmítico, representado por 16:0, pois contém 16 carbonos e nenhuma dupla ligação. Outros ainda podem apresentar anéis de três carbonos, hidroxila ou ramificações de grupos metila (Nelson e Cox, 2014). No que se trata das propriedades físicas dos ácidos graxos, o mesmo autor afirma que, quanto maior o comprimento da cadeia acila e menores as quantidades de ligações duplas, maior a insolubilidade à água. Já o ponto de fusão é influenciado quanto ao grau de insaturação e comprimento da cadeia hidrocarbonada. Por exemplo, os ácidos graxos 12:0 e 24:0, que não possuem ligações duplas, e, portanto, denominados ácidos graxos saturados, quando em temperatura ambiente de 25°C, possuem consistência de cera. Já os ácidos graxos insaturados com mesmo comprimento de cadeia, possuem consistência de líquidos oleosos à mesma temperatura. Som ponto de fusão consideravelmente mais baixo que os ácidos graxos saturados de mesmo comprimento de cadeia é devido aos arranjos

fracamente ordenados oriundos de duplas ligações. Os lipídios mais simples são formados a partir de três ácidos graxos, são os chamados triglicerídeos. Na maioria das células eucarióticas, eles são armazenados no citoplasma celular sob a forma de gotículas, para serem usados como combustível metabólico (Nelson e Cox, 2014).

Os três tipos principais de lipídios de membranas são os fosfolipídios, os glicolipídios e o colesterol. Os fosfolipídios possuem um papel muito importante para a fluidez e permeabilidade seletiva da membrana celular (Voelker, 2008). Constituem a bicamada lipídica, formada por cabeça hidrofílicas, voltada para a parte externa da bicamada lipídica, por sua afinidade em meio aquoso, e caudas hidrofóbicas, posicionadas para o interior da bicamada lipídica, por sua repulsão ao meio aquoso.

Estudos acerca dos lipídios foram realizados em oócitos e embriões, analisando composição de ácidos graxos e conteúdo de triglicerídeos. Ferguson e Leese (1999) quantificaram o conteúdo de triglicérides de oócitos bovinos e embriões pré-implantados até o estágio de blastocisto eclodido, e concluíram que os triglicerídeos podem atuar como fonte de energia durante a maturação e fertilização de oócitos bovinos. Ainda observaram que a presença de SFB como suplemento em meio de cultivo, causa excessiva síntese ou acúmulo de triglicérides em embriões iniciais. Sudano *et al.* (2014) relataram que quanto mais alta concentração de SFB, melhores são as taxas de produção de blastocistos, porém ocorre maior acúmulo lipídico, níveis de apoptose mais elevados e piores índices de sobrevivência à criopreservação. Apesar da relação consolidada entre SFB e acúmulo lipídico em oócitos e embriões, ainda não foi possível esclarecer por qual mecanismo este acúmulo acontece.

Mcevoy *et al.* (2000) observaram que dos 24 ácidos graxos detectados, os ácidos palmítico, esteárico e oleico foram os mais proeminentes em oócitos imaturos de suínos, bovinos e ovinos. Posteriormente, Kim *et al.* (2001) obtiveram os mesmos resultados ao comparar a composição dos ácidos graxos de oócitos bovinos imaturos, frescos e congelados e oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado SFB ou álcool polivinílico. Matorras *et al.* (1998) já havia encontrado resultados semelhantes estudando oócitos humanos que não obtiveram sucesso após a fertilização.

2.1.3 Elongases de ácidos graxos

Em mamíferos, as elongases desempenham papéis fundamentais na regulação do comprimento e do grau de insaturação dos ácidos graxos e, conseqüentemente, de suas funções e destinos metabólicos. A diversidade de funções biológicas exercidas pelos lipídios reflete no fato de que a maioria das células tem a capacidade de sintetizar ácidos graxos mais simples. Para que haja a manutenção da homeostase, é necessário que ocorram processos como o de alongamento de lipídios, que originam ácidos graxos mais complexos destinados a funções específicas. É importante destacar que a interrupção destes processos pode levar a resultados negativos, como os encontrados por Moon *et al.* (2009) onde descreveu que camundongos *ELOVL5* knockout desenvolvem esteatose hepática, com níveis elevados de triacilgliceróis hepáticos devido às atividades aumentadas de SREBP-1c e aos produtos de seus genes alvo, como o transportador de glicose sensível a insulina tipo 4 e acetilcolina, além de problemas reprodutivos em fêmeas.

Na célula eucariótica, ácidos graxos sintetizados no citosol pela enzima ácido graxo sintase ou derivados da dieta podem ser ainda dessaturados e/ou alongados em ácidos graxos de cadeia longa (16C, 18C) e de cadeia muito longa (C20) por enzimas específicas ligadas à membrana localizadas no retículo endoplasmático (Guillou *et al.*, 2010).

Como é também o caso das reações realizadas apenas pela ácido graxo sintase citosólica, o alongamento do ácido graxo microsomal envolve a adição de unidades de dois carbonos a um acil-CoA graxo empregando malonil-CoA como dador e NADPH como agente redutor. O alongamento é conseguido com quatro reações enzimáticas separadas: condensação entre o acil-CoA graxo e malonil-CoA para produzir 3-cetoacil-CoA; redução de 3-cetoacil-CoA para gerar 3-hidroxi-acil-CoA; desidratação de 3-hidroxi-acil-CoA para produzir trans-2-enoil-CoA; e, finalmente, redução de trans-2-enoil-CoA para formar o acil-CoA alongado (Cinti *et al.*, 1992). Em mamíferos, as duas reduções são realizadas pela 3-cetoacil-CoA redutase e trans-2,3, -enoil-CoA redutase, respectivamente (Moon e Horton, 2003). Em mamíferos, a reação de condensação inicial é catalisada pelas enzimas elongase, conhecidas como alongação de ácidos graxos de cadeia muito longa (ELOVLs) (Moon *et al.*, 2001). Até o momento, sete proteínas ELOVL (ELOVL1-7) foram identificadas, são elas ELOVL1, ELOVL3, ELOVL6 e ELOVL7 utilizando ácidos graxos saturados e monoinsaturados como substrato e ELOVL2, ELOVL4 e

ELOVL5 com seletividade para ácidos graxos poliinsaturados (Leonard *et al.*, 2000; Tvrdik *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2001).

Dos diferentes genes *ELOVL*, *ELOVL1*, *ELOVL5* E *ELOVL6* são expressos de forma generalizada em todos os tecidos, enquanto que *ELOVL2*, *ELOVL3*, *ELOVL4* e *ELOVL7* apresentam níveis de expressão mais específicos do tecido. Embora as consequências fisiológicas de tais padrões de expressão específicos de tecido ainda não sejam conhecidas, estudos *in vivo*, incluindo os que envolvem várias novas estirpes transgênicas de ratos, indicam que isto está relacionado com as necessidades específicas do tecido para o VLCFA (ácido graxos de cadeia muito longa) sintetizado pelas diferentes elongases (Guillou *et al.*, 2010).

ELOVL5 é expresso ubiquamente, segundo estudos realizados até o presente momento, com níveis mais altos no fígado, testículos e glândulas supra-renais (Leonard *et al.*, 2000). Embora a expressão de ELOVL5 possa ser detectada na maioria dos tecidos humanos, os níveis mais altos de mRNA foram encontrados nos testículos e na glândula adrenal, consistente com o fato de que esses dois tecidos contêm altos níveis de ácido docosapentanoico (22: 5n-6), um metabolito de PUFA (ácidos graxos poliinsaturados). Rat ELO1 / ELOVL5 (rELO1) demonstraram alongar várias espécies diferentes de PUFA, especialmente ácido estearidônico (18: 4n-3) e ácido γ -linolênico (18: 3n-6) (Jakobsson *et al.*, 2006). Wang *et al.* (2005) sugere que essa enzima desempenha um papel importante no desenvolvimento do fígado durante o período pós-natal. ELOVL5 foi proposto para estar envolvido no alongamento de ácidos graxos com 18 e 20 carbonos.

2.1.4 Knockdown gênico

Os agentes que inibem a expressão de genes selecionados através de um mecanismo de emparelhamento de bases de Watson / Crick são habitualmente referidos como agentes anti-sentido ou knockdown de genes. Este agente deve alcançar alta especificidade e não deve ter efeitos fora do alvo para o qual foi desenvolvido. Na atualidade existem três ferramentas mais comumente utilizadas: 1) S-DNA (DNA ligado ao fosforotioato); 2) siRNA (RNA interferente curto); e 3) Mo (Morpholino). Os S-DNAs causam múltiplos efeitos fora do alvo, em grande parte porque os enxofres em sua espinha dorsal se ligam a muitas proteínas diferentes e ainda alcançam uma baixa especificidade de sequência porque os duplexes de S-DNA / RNA são tão curtos quanto os 7 pares de bases, sendo clivados pela RNase H. Os siRNAs também causam efeitos fora do alvo, mas designs melhorados podem

em breve evitar tais efeitos. Os siRNAs também proporcionam apenas uma especificidade de sequência limitada, porque as suas sequências-guia curtas determinam largamente quais os transcritos de genes que serão bloqueados ou clivados, e essas sequências-guia parecem reconhecer informação insuficiente para atingir unicamente um transcrito de gene selecionado. Os Mo são virtualmente livres de efeitos fora do alvo - provavelmente porque eles não podem interagir eletrostaticamente com as proteínas. Atingem uma especificidade de sequência requintada - em grande parte porque eles devem se ligar pelo menos de 14 a 15 bases contíguas para bloquear um transcrito gênico, e isso constitui informação de sequência suficiente para direcionar unicamente um transcrito de gene selecionado. Devido à sua liberdade de efeitos fora do alvo, excelente especificidade de sequência, estabilidade completa em sistemas biológicos e alvos altamente previsíveis, os Mo dominam as mais exigentes de todas as aplicações de knockdown gênico, o estudo em embriões em desenvolvimento (James, 2007).

Oligonucleotídeos de Morpholino (Oligos) são cadeias curtas de cerca de 25 subunidades de Mo. Cada subunidade é composta de uma base de ácidos nucleicos, um anel de morfolina e uma ligação intersubunidade não iônica de fosforodiamidato. Os Mo não degradam seus alvos de RNA, mas atuam através de um mecanismo de bloqueio estérico independente de RNase H. Eles são completamente estáveis nas células e não induzem respostas imunes (Genetools, 1980). Para se obter uma sequência de Oligos, deve-se selecionar uma sequência genética alvo que se deseja estudar em seguida, monta-se um oligômero de bases genéticas (adenina, citosina, guanina e timina ou uracila) complementares àquela sequência selecionada. Quando esse oligo se liga à sua sequência alvo, ocorre a sua desativação (Summerton e Weller, 1997). Além de serem utilizados para estudar funções de transcritos de mRNA em embriões de Zebrafish (*Danio rerio*) (Nasevicius e Ekker, 2000), anfíbios *Xenopus* (Heasman *et al.*, 2000), ouriços-do-mar (Howard *et al.*, 2001) e ratos (Coonrod *et al.*, 2001), esta ferramenta está sendo estudada para uso em humanos, no tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) (Corinne, 2013).

2.2 REFERÊNCIAS

CINTI, D. L. et al. The fatty acid chain elongation system of mammalian endoplasmic reticulum. **Progress in Lipid Research**, v. 31, n. 1, p. 1-51, 1992/01/01/ 1992. ISSN

0163-7827. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016378279290014A>.

COONROD, S. A. et al. A morpholino phenocopy of the mouse MOS mutation. **genesis**, v. 30, n. 3, p. 198-200, 2001/07/01 2001. ISSN 1526-954X. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/gene.1065>. Acesso em: 2018/08/22.

CORINNE, A. B. A. M. J. A. W. Cell Penetrating Peptide Delivery of Splice Directing Oligonucleotides as a Treatment for Duchenne Muscular Dystrophy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 16, p. 2948-2962, 2013. ISSN 1381-6128/1873-4286. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/node/108490/article>.

FAO. **Produção de cabeças de gado no Brasil 2017**.

FARIN, P. W.; SLENNING, B. D.; BRITT, J. H. Estimates of pregnancy outcomes based on selection of bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Theriogenology**, v. 52, n. 4, p. 659-670, 1999/09/01/ 1999. ISSN 0093-691X. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X99001600>.

FERGUSON, E. M.; LEESE, H. J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 116, n. 2, p. 373-378, 1999. Disponível em: <http://www.reproduction-online.org/content/116/2/373.abstract>.

FILHO, E. S. et al. A method for semi-automatic grading of human blastocyst microscope images. **Human Reproduction**, v. 27, n. 9, p. 2641-2648, 2012. ISSN 0268-1161. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/des219>.

GENETOOLS. What Do We Make? , 1980. Disponível em: <http://www.genetools.com/>. Acesso em: 22/08/2018.

GUILLOU, H. et al. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. **Progress in Lipid Research**, v. 49, n. 2, p. 186-199, 2010/04/01/ 2010. ISSN 0163-7827. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163782709000678>.

HEASMAN, J.; KOFRON, M.; WYLIE, C. β Catenin Signaling Activity Dissected in the Early Xenopus Embryo: A Novel Antisense Approach. **Developmental Biology**, v. 222, n. 1, p. 124-134, 2000/06/01/ 2000. ISSN 0012-1606. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160600997203>.

HOWARD, E. W. et al. SpKrl: a direct target of beta-catenin regulation required for endoderm differentiation in sea urchin embryos. **Development**, v. 128, n. 3, p. 365, 2001. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/content/128/3/365.abstract>>.

HUDZIAK, R. M. et al. Resistance of Morpholino Phosphorodiamidate Oligomers to Enzymatic Degradation. **Antisense and Nucleic Acid Drug Development**, v. 6, n. 4, p. 267-272, 1996/01/01 1996. ISSN 1087-2906. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/oli.1.1996.6.267>>. Acesso em: 2018/09/20.

IETS. 2016 **Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals.** International Embryo Transfer Society. https://www.iets.org/pdf/comm_data/IETS_Data_Retrieval_Report_2016_v2.pdf. 2016

JAMES, E. S. Morpholino, siRNA, and S-DNA Compared: Impact of Structure and Mechanism of Action on Off-Target Effects and Sequence Specificity. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 7, p. 651-660, 2007. ISSN 1568-0266/1873-4294. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/node/78086/article>>.

KIM, J. Y. et al. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. **Reproduction**, v. 122, n. 1, p. 131-138, 2001. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/122/1/131.abstract>>.

LEESE, H. J. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. **BioEssays**, v. 24, n. 9, p. 845-849, 2002/09/01 2002. ISSN 0265-9247. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/bies.10137>>. Acesso em: 2018/07/31.

_____. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. **Reproduction**, v. 143, n. 4, p. 417-427, 2012. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/143/4/417.abstract>>.

LEONARD, A. E. et al. Cloning of a human cDNA encoding a novel enzyme involved in the elongation of long-chain polyunsaturated fatty acids. **Biochemical Journal**, v. 350, n. 3, p. 765-770, 2000. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0034664989&doi=10.1042%2f0264-6021%3a3500765&partnerID=40&md5=6f811c18cc2742b960a1c7dbcf2dd14f>>.

MATORRAS, R. et al. Fatty acid composition of fertilization-failed human oocytes. **Human Reproduction**, v. 13, n. 8, p. 2227-2230, 1998. ISSN 0268-1161. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/humrep/13.8.2227>>.

MCEVOY, T. G. et al. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, n. 1, p. 163-170, 2000. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/118/1/163.abstract>>.

MOON, Y.-A.; HAMMER, R. E.; HORTON, J. D. Deletion of ELOVL5 leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. 3, p. 412-423, 07/22/received09/24/revised 2009. ISSN 0022-2275/1539-7262. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2638104/>>.

MOON, Y.-A.; HORTON, J. D. Identification of Two Mammalian Reductases Involved in the Two-carbon Fatty Acyl Elongation Cascade. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 9, p. 7335-7343, 2003. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/278/9/7335.abstract>>.

MOON, Y. A. et al. Identification of a Mammalian Long Chain Fatty Acyl Elongase Regulated by Sterol Regulatory Element-binding Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 48, p. 45358-45366, 2001. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0035977004&doi=10.1074%2fjbc.M108413200&partnerID=40&md5=80479dc8dfaf33886db049cff2282803>>.

NASEVICIUS, A.; EKKER, S. C. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. **Nature Genetics**, v. 26, p. 216, 10/01/online 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/79951>>.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 6. New York: W.H.Freeman and Company, 2014. ISBN 9781429234146.

OHANIAN, J.; OHANIAN, V. Sphingolipids in mammalian cell signalling. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 58, n. 14, p. 2053-2068, 2001/12/01 2001. ISSN 1420-9071. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/PL00000836>>.

OVERSTRÖM, E. W. In vitro assessment of embryo viability. **Theriogenology**, v. 45, n. 1, p. 3-16, 1996/01/01/ 1996. ISSN 0093-691X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X96846255>>.

PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859-869, 1995/10/15/ 1995. ISSN 0093-691X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X95002719>>.

RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 2, p. 234-248, 2002/02/01 2002. ISSN 1040-452X. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/mrd.1153>>. Acesso em: 2018/07/24.

ROCHA, J. C. et al. A Method Based on Artificial Intelligence To Fully Automatize The Evaluation of Bovine Blastocyst Images. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 7659-7659, 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28794478>>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC5550425/>>.

SIRARD, M.-A. et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126-136, 2006/01/07/ 2006. ISSN 0093-691X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X05004103>>.

SUDANO, M. J. et al. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. **Zygote**, v. 22, n. 2, p. 124-131, 2014. ISSN 0967-1994. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/article/crucial-surviving-aspects-for-vitrified-in-vitroproduced-bovine-embryos/141F69F9B86050EDA3F062C86AFAEA30>>.

SUMMERTON, J.; WELLER, D. Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation, and Properties. **Antisense and Nucleic Acid Drug Development**, v. 7, n. 3, p. 187-195, 1997/06/01 1997. ISSN 1087-2906. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/oli.1.1997.7.187>>. Acesso em: 2018/08/22.

TVRDIK, P. et al. Role of a New Mammalian Gene Family in the Biosynthesis of Very Long Chain Fatty Acids and Sphingolipids. **The Journal of Cell Biology**, v. 149, n. 3, p. 707, 2000. Disponível em: <<http://jcb.rupress.org/content/149/3/707.abstract>>.

WANG, Y. et al. Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 4, p. 706-715, 2005. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-21744446895&doi=10.1194%2fjlr.M400335-JLR200&partnerID=40&md5=b3d393888af664275ea3ca6a8f59dfe1>>.

ZHAO, B. et al. Identification of a novel intracellular cholesteryl ester hydrolase (carboxylesterase 3) in human macrophages: compensatory increase in its expression after carboxylesterase 1 silencing. **American Journal of Physiology** -

Cell Physiology, Bethesda, MD, v. 303, n. 4, p. C427-C435,
06/1303/28/received06/11/accepted 2012. ISSN 0363-6143
1522-1563. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3422987/>>.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 *Objetivos gerais*

Compreender o papel da enzima ELOVL5 sobre o desenvolvimento e metabolismo lipídico embrionário.

2.3.2 *Objetivos específicos*

Avaliar os efeitos do Knockdown do gene ELOVL5 sobre o desenvolvimento, conteúdo e composição lipídica e imunolocalização de proteínas de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Estabelecer o uso da tecnologia Morfolinoantisenseoligonucleotídeos para o Knockdown gênico durante o cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

2.4 Hipóteses

A enzima ELOVL5 altera o metabolismo lipídico embrionário;

A enzima ELOVL5 não afeta o desenvolvimento embrionário inicial;

3 **CAPÍTULO II**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico e encontra-se preparado para posterior publicação em revista na qual será submetido para apreciação. As seções Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito.

3.1 ARTIGO CIENTÍFICO

ROLE OF *ELOVL5* ON EMBRYONIC DEVELOPMENT AND LIPID METABOLISM

O conteúdo do artigo foi suprimido para não prejudicar o processo de publicação em revista científica.

4 CONCLUSÕES

O knockdown gênico para ELOVL5 alterou o metabolismo lipídico embrionário, expresso pelo favorecimento do acúmulo citoplasmático de gotas lipídicas e pela alteração do perfil de expressão de algumas espécies lipídicas (fosfatidilcolinas, fosfatidiletolaminas e triacilglicerol), porém, sem sinais do comprometimento do desenvolvimento e qualidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Diante desses resultados, podemos afirmar a importâncias dos lipídios no metabolismo embrionário. Foram levantadas muitas hipóteses, como por exemplo a do efeito compensatório, embora acreditemos que tenha sido esta a explicação para o aumento de proteínas traduzidas, originadas do mRNA temporariamente bloqueado, seria interessante que mais experimentos fossem conduzidos para esclarecer os mecanismos associados a este achado,

Sabe-se que este tema ainda está longe de ser esgotado ou compreendido em toda sua forma, porém é animador notar o interesse de vários grupos de estudos engajados para obter mais resultados e chegar mais próximo dos esclarecimentos.

Como sendo o primeiro trabalho realizado dedicado ao estudo desta enzima em embriões bovinos, os estudos devem ser complementados com pesquisas futuras.