UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO, QUALIDADE E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES CULTIVADOS EM SOFaaci TRADICIONAL E SEQUENCIAL EM TRÊS ATMOSFERAS DE OXIGÊNIO.

Rafaela Faresin Pastorio

Médica Veterinária

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO, QUALIDADE E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES CULTIVADOS EM SOFaaci TRADICIONAL E SEQUENCIAL EM TRÊS ATMOSFESRAS DE OXIGÊNIO.

Rafaela Faresin Pastorio

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia

Coorientadora: Dra. Marina Ragagnin de Lima

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal.

2021

P293a

Pastorio, Rafaela Faresin

Avaliação da produção, qualidade e criotolerância de embriões cultivados em SOFaaci tradicional e sequencial em três atmosferas de oxigênio / Rafaela Faresin Pastorio. -- Jaboticabal, 2021

75 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Joaquim Mansano Garcia

Coorientadora: Marina Ragagnin De Lima

1. Embriões. 2. Metabolismo embrionário. 3. Criopreservação. 4. Estresse Oxidativo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO, QUALIDADE E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES CULTIVADAS EM SOFaaci TRADICIONAL E SEQUENCIAL EM TRÊS ATMOSFERAS DE OXIGÊNIO.

AUTORA: RAFAELA FARESIN PASTORIO
ORIENTADOR: JOAQUIM MANSANO GARCIA
COORIENTADORA: MARINA RAGAGNIN DE LIMA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA (Participaçao Virtual)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI (Participaçao Virtual)
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / FMVA/UNESP - Araçatuba

Prof. Dr. MARCELO BARBOSA BEZERRA (Participaçao Virtual)
Universidade Federal do Semi Árido-UFERSA / Mossoró/RN

Jaboticabal, 16 de dezembro de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RAFAELA FARESIN PASTORIO – nascida em Liberato Salzano – RS, aos 13 dias do mês de maio do ano de 1997; concluiu ensino médio no Colégio Estadual Dr. Liberato Salzano Vieira da Cunha, na cidade de Liberato Salzano em dezembro de 2013; ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Universidade de Passo Fundo – UPF em fevereiro de 2014, onde por dois anos realizou estágios no Hospital Veterinário da mesma instituição, fora da instituição realizou diversos estágios com produção e reprodução de bovinos leiteiros; o estágio curricular foi realizado na Bioklone Reprodução Animal situada na cidade de Jaboticabal com reprodução e ênfase em produção de embriões bovinos *in vitro* por um período de três meses no ano de 2018; o grau de Médica Veterinária foi obtido em 25 de janeiro de 2019, em março do mesmo ano ingressou na pós-graduação a nível de Mestrado no programa de pós-graduação em Medicina Veterinária na área de Reprodução Animal na FCAV – UNESP de Jaboticabal, sob orientação do professor Dr. Joaquim Mansano Garcia, com bolsa financiada pela CAPES.

EPÍGRAFE

Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe?
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei,
Ou nada sei.

Penso que cumprir a vida seja simplesmente
Compreender a marcha e ir tocando em frente,
Como um velho boiadeiro levando a boiada
Eu vou tocando os dias pela longa estrada eu vou,
Estrada eu sou.

Todo mundo ama um dia todo mundo chora,
Um dia a gente chega, no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história,
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz,
De ser feliz.

(Almir Sater/ Renato Teixeira)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Salete e Adílio, por me darem asas para voar, mas sempre me lembrarem que tenho um lar para onde posso voltar, por permitirem que os meus sonhos se tornassem realidade mesmo sob dificuldades e, principalmente por nunca me deixarem desanimar. A minha madrinha Cerli pelo zelo e trabalho para que eu pudesse realizar esse sonho, a minha avó Therezinha pelas orações feitas para que meu caminho sempre fosse de luz e prosperidade. Ao meu namorado Matheus, pelo amor e paciência, que mesmo apesar da distância sempre me deu o apoio necessário para a realização dos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a minha Nossa Senhora Aparecida, por me darem a força espiritual necessária para seguir firme nos dias de dificuldade e desanimo, por me guiarem com luz e sabedoria, me mostrando sempre o melhor caminho a ser trilhado, me dando o discernimento de que as dificuldades fazem parte dos dias difíceis para que eu possa dar valor aos dias bons.

Aos meus pais Salete e Adílio, por todo o amor e zelo mesmo distante. Os 1200 km longe de casa não impediram de eu sentir o amor de vocês sempre presente. Obrigada por me proporcionarem mais essa vivência, por acreditarem em mim e em meu potencial, obrigada por abdicarem de seus sonhos para que os meus pudessem se tornar realidade. Não há palavras que possam ser escritas para agradecer e descrever o amor que sinto por vocês. Obrigada, obrigada, obrigada...

À minha nonna There por todas as orações aos anjos e santos para que eu sempre tivesse força de trilhar meu caminho com sabedoria e proteção, por toda a alegria de ser recebida por ti em uma mesa farta em um almoço de família. Obrigada nonna por tudo, a tua fé, teu exemplo de superação e de ser humano que és me deu forças para seguir em frente.

À minha madrinha Cerli por toda a motivação de me fazer acreditar no meu potencial e seguir em frente, sei que as nossas “peleias” nunca foram em vão hahaha, obrigada por participar disso tudo, por ajudar meus pais a me proporcionarem o desenvolvimento desse mestrado e moradia longe de casa, as vezes o obrigado não sai em palavras, mas o sentimento de amor e gratidão por ti são permanentes.

Ao meu Amor Matheus por aguentar essa distância que tanto judiou durante esse tempo de estudos. Obrigada por sempre me incentivar a ser uma profissional melhor, a me fazer acreditar no meu potencial e a seguir firme na realização dos meus objetivos. O teu apoio foi fundamental para que eu tivesse forças de seguir em frente, te amo!

Aos amigos, pais e compadres Marina e Joaquim, sem vocês e, principalmente, sem o apoio de vocês nada disso seria possível, obrigada por me ampararem e me guiarem corretamente durante esse percurso. Obrigada por serem minha família em Jaboticabal, pelo carinho e receptividade na casa de vocês, obrigada por todos os almoços de domingo junto com as pitchucas Lilica, Mica e Nina. Obrigada pelas marmitas de mãe para a semana hahahaha, obrigada simplesmente por serem vocês! Minha gratidão eterna, que o universo e Deus em sua infinita bondade retribuam a vocês todo o bem que fizeram a mim!

Aos amigos Margarete e Luiz Fernando Matte, por todas as orações e carinho durante essa trajetória. Que alegria a minha ter vocês em minha vida.

Ao meu orientador prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia e a minha coorientadora Dra. Marina Ragagnin de Lima, obrigada por serem exemplo de índole e ética profissional. Há um ditado que diz: “para nos tornarmos águia é preciso voar com águia e não com pombos”, que felicidade a minha em poder aprender a voar com vocês, conviver esse período e aprender todos os dias. Obrigada por confiarem em mim e me instruírem sempre pelo melhor caminho.

À Bioklone Reprodução Animal a qual já considero minha casa, pela acolhida que recebi de toda a equipe. Obrigada por ter me proporcionado o ensino desde o primeiro estágio.

À minha amiga Janice Cronst (Bere) por toda a amizade durante esse período, por sempre me ouvir e aconselhar. Obrigada por sempre estar presente em minha vida!

À minha prima, amiga e irmã Leticia Faresin, por todo o companheirismo e ajuda mesmo tão longe. Obrigada por sempre torcer por mim, o teu apoio é essencial.

Às minhas amigas e colegas de pós-graduação Giovana Barros Nunes, Maria Amélia Pupim, Naiara Nantes, Katiucha Lera, Luana Gomes e Cíntia Rodrigues por auxilio no desenvolvimento das análises ou até mesmo pelas risadas durante os dias de disciplina.

À Adriana Menezes do Amaral, a Drika, por todos o apoio e carinho durante este tempo em Jaboticabal, obrigada!

À amiga e estagiaria Leticia Monólio, pela parceria e companheirismo de viagens para análise dos embriões e risadas durante os dias de serviço.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal da FCAV pela honra de poder aprender com vocês e levar esse conhecimento para a vida.

A todos os funcionários do Departamento de Reprodução Animal da FCAV em especial a técnica Roberta Vantini por todos os ensinamentos e ajuda durante o início do meu mestrado.

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

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV – Unesp câmpus de Jaboticabal, em especial ao Departamento de Reprodução Animal e ao programa de pós-graduação por toda a infraestrutura e apoio disponibilizado para a realização dos experimentos e oportunidades.

SUMÁRIO

Páginas

LISTA DE TABELAS ix

LISTA DE FIGURAS x

RESUMO xii

ABSTRACT xiii

1 INTRODUÇÃO 1

2 REVISÃO DE LITERATURA 4

2.1 Produção *in vitro* de embriões bovinos 4

2.2 Fontes proteicas utilizadas para PIVE 6

2.3 Metabolismo Embrionário 9

2.3.1 Metabolismo da glicose 12

2.3.1.1 Glicólise 12

2.3.1.2 Via das pentoses-fosfato 13

2.3.2 Metabolismo do piruvato 15

2.3.3 Metabolismo dos ácidos graxos 16

2.3.4 Metabolismo dos aminoácidos 17

2.3.5 Ciclo do ácido cítrico e cadeia respiratória mitocondrial 18

2.4 Estresse oxidativo 21

3 MATERIAL E MÉTODOS 24

3.1 Local de experimento 24

3.2 Delineamento experimental 24

3.3 Obtenção dos oócitos 26

3.4 Busca e seleção dos oócitos 27

3.5 Maturação *in vitro* (MIV) 27

3.6 Fertilização *in vitro* (FIV) 28

3.7 Cultivo e desenvolvimento embrionário *in vitro* (CIV) 29

3.8 Renovação dos meios de cultivo embrionário 31

3.9 Vitrificação e aquecimento embrionário 32

3.10 Avaliação da criotolerância embrionária 33
3.11 Mensuração de Espécies reativas de oxigênio (EROs) em embriões 34
3.12 Contagem do número total de células embrionárias 36
3.13 Análise estatística 37
4 RESULTADOS 38
4.1 Produção e qualidade embrionária 38
4.2 Reaquecimento e qualidade embrionária 41
5 DISCUSSÃO 44
6 CONCLUSÃO 49
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos componentes e concentrações utilizadas nos meios de cultivo embrionário, SOFaaci tradicional e SOFaaci sequencial. 30

Tabela 2. Produção de embriões bovinos em meio SOFaaci, normal e sequencial nas atmosferas de 20, 12 e 5% de O_2. 39

Tabela 3. Taxa de sobrevivência e degeneração embriões bovinos vitrificados, após 48h de reaquecimento. 41

Tabela 4. Embriões bovinos recuperados após vitrificação, avaliados quando a expansão, eclosão e estresse oxidativo após 48h reaquecimento. 42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases da glicose. Fase de investimento (A) e fase de pagamento (B) (Nelson; Cox, 2019).....13
Figura 2. Via das pentoses fosfato (Nelson; Cox, 2019). 15
Figura 3. Entrada dos ácidos graxos na matriz mitocondrial através do complexo acil-carnitina (Nelson; Cox, 2019).....17
Figura 4. Degradação dos aminoácidos e formação de compostos do ciclo do ácido cítrico (Nelson; Cox, 2019).....18
Figura 5. Reações do ciclo do ácido cítrico (Nelson; Cox, 2019). 19
Figura 6. Esquema da fosforilação oxidativa e síntese de ATP (Nelson; Cox, 2019). 21
Figura 7. Defesa celular contra EROs utilizando glutationa (Fonte: a autora).....23
Figura 8. Esquema do delineamento experimental mostrando a troca dos meios de cultivo celular utilizados no experimento e o momento da vitrificação...26
Figura 9.Técnica Bag System para cultivo embrionário. A: retirada do ar do interior da embalagem através de uma bomba a vácuo, B: Bag system com mistura gasosa já injetada para cultivo embrionário. 31
Figura 10. Embriões corados pela sonda CellRox™ Green e avaliados em epifluorescência para detecção de espécies reativas de oxigênio. 35
Figura 11. Embriões ao sétimo dia de cultivo corados com Hoescht 33342, para contagem do número de células embrionárias totais. 37
Figura 12. Diagrama de produção embrionária no meio de cultivo SOFaaci tradicional (preto) e SOFaaci sequencial (cinza) x atmosfera de O2 A1(20%), A2 (12%) e A3 (5%) para produção de embriões in vitro. Para análise de interação entre os fatores foi utilizado Teste F.....40
Figura 13. Diagrama do número de células do meio de cultivo SOFaaci tradicional (preto) e SOFaaci sequencial (cinza) x atmosfera de O_2 A1(20%), A2 (12%) e A3 (5%) para número de células embrionárias totais. Para análise de interação entre os fatores foi utilizado Teste F.....40

Figura 14. Embriões reaquecidos e recultivados em SOFaaci sequencial onde apresentam o rompimento da zona pelúcida, porém sem êxito para eclosão total, analisados através de microscopia óptica com aumento de 40x, fotografados com o software Q-Capture. 43

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO, QUALIDADE E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES CULTIVADOS EM SOFaaci TRADICIONAL E SEQUENCIAL EM TRÊS ATMOSFERAS DE OXIGÊNIO

RESUMO – O presente estudo avalia a produção, qualidade, criotolerância e estresse oxidativo de embriões bovinos desenvolvidos em dois meios de cultivo, SOFaaci tradicional e SOFaaci sequencial, em diferentes atmosferas de cultivo. Um total de 11640 cumulus oócitos foram maturados em meio de maturação (TCM 199) por 24h. Após os oócitos foram co-incubados com sêmen em meio Talp-FIV por aproximadamente 20h. Logo, os presumíveis zigotos foram cultivados em meio SOFaaci tradicional ou SOFaaci sequencial. Seis grupos experimentais foram formados, MT20= meio tradicional a 20% de O_2; MT12= meio tradicional a 12% de O_2; MT5= meio tradicional a 5% de O_2; MS20= meio sequencial a 20% de O_2; MS12 = meio sequencial em 12% de O_2 e MS5= meio sequencial em 5% de O_2. O cultivo dos embriões com o meio sequencial foi iniciado com SOFaaci A, às 96 e 120hpf era feito a substituição de 75% do volume das gotas de CIV com o meio SOFaaci B. Nos grupos em que foi feito o CIV com meio SOFaaci tradicional, a renovação era realizada da mesma maneira, porém com o próprio SOFaaci tradicional. Ao se completarem sete dias de CIV os embriões foram vitrificados em hastes de vitrificação. Os resultados foram analisados com ANOVA e posterior Teste de Tukey e Teste de X^2 com nível de significância à 5%. Na produção embrionária, os grupos em que foi utilizado o meio SOFaaci tradicional foram superiores ao meio SOFaaci sequencial (P=0.028) e a redução na atmosfera de O_2 também teve efeito benéfico na taxa de embriões produzidos MT20= 45,3%; MT12= 49,7%; MT5= 53,9%; MS20= 40,2%; MS12= 41,6%; MS5= 45,0%, o número de células totais foi maior nos grupos cultivados em meio tradicional e atmosfera controlada (P<0.05) (MT20=114; MT12= 128; MT5=131; MS20=98; MS12=110; MS5= 112;), tendo, também um maior estresse oxidativo em embriões produzidos em atmosfera controlada (P<0.01) (MT20=4,10; MT12=5,30; MT5=7,46; MS20=4,23; MS12=8,27; MS5=5,93). Os embriões vitrificados e reaquecidos que foram cultivados em SOFaaci tradicional não diferiram entre si na taxa de recuperação nas três atmosferas utilizadas MT20= 60,2%; MT12= 66,6%; MT5= 60,6%. Por outro lado, os embriões cultivados em SOFaaci sequencial apresentaram maior taxa de recuperação na atmosfera de 5% de O_2 (P<0,05) MS20= 42,3%, MS12= 53,0%; MS5= 80,1%. Entretanto, a taxa de eclosão dos embriões vitrificados e reaquecidos cultivados em meio SOFaaci tradicional nas atmosferas de 20% e 12% de O_2 apresentaram as maiores taxas de eclosão (P<0,05) MT20= 70,7%; MT12= 81,2% e semelhante aos embriões cultivados em SOFaaci sequencial na atmosfera de 12% de O_2 MT12= 70,9%. O estresse oxidativo de embriões vitrificados, não diferiu entre os grupos. Concluímos que embriões cultivados em SOFaaci tradicional em atmosferas controladas, apresentam maior produção, número de células e concentrações de espécies reativas de oxigênio. A recuperação após o reaquecimento foi melhor no SOFaaci sequencial na atmosfera de 5% de O_2, mas as maiores taxas de eclosão foram obtidas em SOFaaci tradicional e sequencial na atmosfera de 12% de O_2.

Palavras-chave: metabolismo embrionário, fontes energéticas, meio sequencial, tensão de oxigênio, estresse oxidativo.

EVALUTION OF EMBRYO PRODUCTION AND QUALITY, DEVELOPED IN VITRO ON A SOFaaci TRADITIONAL OR SEQUENTIAL MEDIUM IN THREE OXYGEN ATMOSFERES

ABSTRACT – This study evaluates bovine embryos production, quality, cryotolerance and oxidative stress when developed in two culture medias, traditional SOFaaci and sequential SOFaaci in different culture atmospheres. A total of 11.640 cumulus oocytes were matured in maturation medium (TCM 199) for 24h. Afterwards, the oocytes were co-incubated with semen in Talp-FIV medium for approximately 20h. Therefore, presumptive zygotes were cultured in traditional SOFaa or sequential SOFaaci medium. Six experimental groups were formed, TM20= traditional medium at 20% O_2; TM12= traditional medium at 12% O_2; TM5= traditional medium at 5% O_2; SM20= Sequential medium at 20% O_2; SM12 = sequential medium in 12% O_2 and SM5= sequential medium in 5% O_2. The cultivation of embryos with the sequential medium was started with SOFaaci A, at 96 and 120hpf, 75% of the volume of the CIV drops was replaced with SOFaaci B medium. In groups where the CIV was carried out with traditional SOFaa, the renovation was carried out in the same way, but with the traditional SOFaa itself. At the end of seven days of CIV, the embryos were vitrified in vitrification rods. The results were analyzed with ANOVA and subsequent Tukey Test, and X^2 Test with a 5% significance level. In embryo production, the groups in which the traditional medium was used were superior to the sequential medium (P=0.028) and the reduction in the O^2 atmosphere also had a beneficial effect on the rate of embryos produced (TM20=45%; TM12=49%; TM5=53%; SM20= 40%; SM12=41%; SM5: 45%), the number of total cells was higher in the groups cultivated in traditional medium and controlled atmosphere (P=0.5) (TM20=114; TM12= 128; TM5=131; SM20= 98; SM12= 110; SM5= 112;), also having a higher oxidative stress in sequential medium and atmosphere embryos controlled (P=0.001) (TM20=4,10; TM12=5.30; TM5=7.46; SM20=4.23; SM12=8.27; SM5=5.93). The vitrified and reheated embryos that were cultivated in traditional SOFaaci did not differ from each other in the recovery rate in the three atmospheres used TM20 = 60.2%; TM12 = 66.6%; TM5 = 60.6%. On the other hand, embryos cultured in sequential SOFaaci higher rate of recovery in atmosphere 5% O2 (P < 0.05) SM20 = 42.3%, SM12 = 53.0%; SM5 = 80.1%. However, the hatch rate of vitrified and rewarmed embryos cultured in traditional SOFaaci medium in 20% and 12% O2 atmospheres outside the highest hatch rates (P <0.05) TM20 = 70.7%; TM12 = 81.2% and similar to embryos cultured in sequential SOFaaci in the atmosphere of 12% O2 SM12 = 70.9%. Oxidative stress of vitrified embryos did not differ between groups. We concluded that embryos cultivated in traditional SOFaaci in controlled atmospheres present greater production, number of cells and groups of reactive oxygen species. Recovery after reheat was better in sequential SOFaaci in 5% O2 atmosphere, but higher hatch rates were upgraded in traditional and sequential SOFaaci in 12% O2 atmosphere.

Keywords: embryonic metabolism, energy sources, sequential medium, oxygen tension, oxidative stress.

1 INTRODUÇÃO

Com o crescimento da população mundial, a produção de proteína animal é de suma importância para a saúde pública, sendo um alimento rico em aminoácidos, vitaminas do complexo B e minerais. Segundo a ONU (2019), a população mundial terá um crescimento significativo até 2050, podendo chegar a 9,5 bilhões de seres humanos, tendo uma exigência maior demanda de alimentos.

O Brasil, além de um dos maiores países em termos de território, também conta com o segundo maior rebanho bovino do mundo, com um número superior a 170 milhões de cabeças (IBGE, 2017). Dados do censo agropecuário brasileiro mostram que o agronegócio ocupa 41% do território nacional, correspondendo a aproximadamente 350 milhões de hectares (há), nos quais 45% é destinado a pastagens para bovinocultura (IBGE, 2017).

Uma das alternativas para produzirmos mais alimentos, em uma menor quantidade de área disponível, é selecionarmos os animais geneticamente superiores e otimizar o desemprenho reprodutivo deles, visando assim, sustentar altas produções de carne e leite para suprir as necessidades do crescimento populacional, bem como, fonte de alimento nutritivo (Davis e White, 2020). Tendo isso em consideração, percebeu-se que a fertilidade dos animais vem diminuindo conforme sua capacidade zootécnica aumenta, isso pode ser devido a seleção única caracterizada, que necessitou de mudanças fisiológicas, priorizando a produção de leite ou carne, diminuindo assim o suprimento para demais sistemas do organismo (Snijders et al., 2001; Walsh; Williams, Evans, 2011).

Segundo dados da IETS (*International Embryo Technology Society*) de 2019 (Viana, 2020), o Brasil é o maior produtor de embriões da América Latina e o segundo maior do mundo. A partir disso, pode-se perceber a importância e significância das biotecnologias para a produção mundial de produtos de origem animal, em que visa difundir o melhoramento genético, se tornando mais econômico e aproveitando um maior tempo reprodutivo dessas fêmeas, pelo fato de poder coletar seus oócito independente da categoria animal, gestação e idade, bem como, acasalar com touros de diferentes potenciais genéticos (Watanabe et al., 2008).

Durante o desenvolvimento i*n vitro*, o embrião necessita de diversas fontes energéticas para seu progresso e esses são encontrados nos meios de cultivo. Dentre os meios mais utilizados, encontra-se o SOF (Fluído de Oviduto Sintético), que é semelhante a constituição dos fluídos encontrados no ovidutos de animais, sendo que esse teve seu desenvolvimento a partir da análise bioquímica dos fluídos de ovidutos de ovinos (Tervit; Whittingham, Rowson, 1972; Walker et al., 1996). O SOF consiste em ofertar todos os nutrientes para esse estágio embrionário, deixando que o embrião metabolize o necessário para suprir sua necessidade da biossíntese em estágio de pré e pós-compactação, sendo chamada de a filosofia "*let the embryo choose*" (deixe o embrião escolher) (Biggers, 2000). A partir dos estudos que demonstram que a composição dos fluidos alteram (Restall e Wales, 1966; Stanke et al., 1974; Miller e Schultz, 1987 Gardner e Lee, 1990; Lamy et al., 2018; Mahé et al., 2021) durante o percurso do embrião no trato reprodutivo *in vivo*, iniciou-se então o desenvolvimento de meios sequenciais (Lane et al., 2003; Wang et al., 2011; Choi et al., 2016), visando a dinâmica de fisiologia e metabolismo dos embriões, conferindo a eles uma condição de cultivo mais próxima as encontradas *in vivo*.

Os meios sequenciais consistem na oferta de componentes específicos para os estágios pré-compactação, sendo piruvato e lactato em maior quantidade, e fase de pós-compactação, em que uma nova formulação de meio é concedido às estruturas, tendo altas concentrações de glicose e redução do piruvato e lactato, tendo como filosofia de aplicabilidade "*back to nature"* (de volta a natureza) (Machtinger e Racowsky, 2012).

Outro fator importante que atua na regulação metabólica embrionária é a concentração de oxigênio que os embriões estão expostos. A concentração de oxigênio no oviduto e útero são de aproximadamente 3 – 9 % (Mastroianni e Jones, 1965), em que essa condição fisiológica estimula a captação e uso adequado glicose, aumentando a viabilidade, clivagem, número de células e taxa de produção de blastocistos (Harvey, 2007). No entanto, a maioria dos embriões produzidos *in vitro* são cultivados em ambiente de O_2 atmosférico (20%), por ser um ambiente com alta concentração de oxigênio, ocorre uma desregulação no metabolismo dos mesmos, fazendo com que consumam mais aminoácidos, acarretando em uma maior produção

de metabolitos tóxicos, diminuindo sua viabilidade de desenvolvimento, podendo acarretar em morte embrionária e baixas taxas de blastocisto (Wale e Gardner, 2012).

Sugere-se que os meios sequencias proporcionem um aumento da produção e qualidade embrionária, pelo fato de serem mais próximo as condições encontradas no ambiente uterino. A disponibilização de nutrientes necessários para cada estágio de seu desenvolvimento, bem como a concentração adequada de oxigênio em correspondente estágio, pode modular as diferentes vias metabólicas do embrião, alterando o seu desenvolvimento (Gardner; Havey, 2015), deste modo, estabelecer em um meio de cultivo um equilíbrio de nutrientes, bem como as concentrações de O_2, mais próximo do trato reprodutivo, acarreta em uma prevenção ao estresse embrionário, mantendo a viabilidade de desenvolvimento promovendo superiores taxas de blastocistos (Lane et al., 2003).

Tendo em vista o minucioso processo de produção de embriões bovinos *in vitro*, bem como os aumentos de resultados, este trabalho teve por objetivo desenvolver um meio SOF sequencial, ofertando os requerente energéticos e aminoácidos que os embriões precisam em cada etapa do seu desenvolvimento associado a diferentes níveis de atmosfera de oxigênio no estágio de cultivo, com o intuito de aumentar as taxas de produção de blastocistos, melhorar a qualidade estrutural, bem como reduzir os danos causados pelas altas concentrações de oxigênio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção *in vitro* de embriões bovinos

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma técnica que vem sendo desenvolvida durante longos anos, visando acelerar o melhoramento genético, bem como a reprodução de bovinos e, também, de outras espécies. Ademais, a técnica proporciona a possibilidade de pesquisas na área de reprodução animal podendo, desse modo, entendermos mais sobre a fisiologia, bioquímica e, principalmente, os mecanismos de desenvolvimento embrionário.

O coelho foi a primeira espécie que se conseguiu desenvolver uma prole *in vitro***,** no ano de 1959 (Chang, 1959). Em 1968, nasceram os primeiros camundongos de laboratório (Whittingham, 1968) e, em 1987, os primeiros bezerros oriundos totalmente de um procedimento de PIVE nasceram (Lu et al., 1987). A partir dessas conquistas científicas, as técnicas de maturação, fertilização e cultivo *in vitro* vem sendo pesquisadas e aprimoradas, bem como muito utilizadas na escala comercial para a melhoria de rebanhos leiteiros e de corte.

A coleta dos oócitos bovinos pode ser realizada através de ovários de abatedouros, normalmente empregados para fins de pesquisas, utilizando uma agulha hipodérmica conectada à uma seringa ou um sistema a vácuo e pela técnica de aspiração folicular guiada por ultrassonografia (*Ovum Pick Up* - OPU), a qual permite a coleta dos oócitos, a partir de folículos de 2 a 8 mm, com ou sem estimulação hormonal de vacas doadoras, sendo uma técnica minimamente invasiva (Pieterse et al., 1988; Van Wagtendok- De Leeuw et al., 2000).

A maturação *in vitro* (MIV), inicia-se imediatamente após a remoção do oócito de dentro do folículo e, é a progressão do estágio de prófase da meiose I, até o estágio de metáfase da meiose II, bem como a ocorrência da extrusão do primeiro corpúsculo polar (Gilchrist; Thompson, 2007). A duração da MIV varia de 18 a 24 horas e envolve uma série de modificações citoplasmáticas e nucleares, que possibilitam o oócito

preparar-se para a fecundação e seguir a termo o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Galli et al., 2003; Fissore et al., 2002; Gonçalves et al., 2008).

As alterações citoplasmáticas que ocorrem consistem na reorganização das organelas, sendo elas as mitocôndrias (Hyttel et al., 1986), complexo de Golgi (Payne e Schatten, 2003; Moreno; Schatten; Ramalho-Santos, 2002), retículo endoplasmático (Kline, 2000; Stricker, 2006), grânulos corticais (Hosoe e Shioya, 1997; Thibault et al., 1987) e o aumento de síntese proteica pelos ribossomos (Tomek et al., 2002).

As alterações nucleares consistem na quebra da vesícula germinativa, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico (Gottardi; Mingoti, 2009), após isso, o oócito permanecerá em estágio de metáfase da meiose II até a fecundação, em que ocorrerá a extrusão do segundo corpúsculo polar e progressão até telófase da meiose II (Mayes; Sirard, 2001).

Subsequente a MIV, os oócitos são co-incubados juntamente com os espermatozoides em uma placa de cultivo celular preparada para a fertilização *in vitro* (FIV). A FIV se dá a partir da penetração do espermatozoide na zona pelúcida e posterior fusão do espermatozoide com o oócito, assim, haverá a formação dos pró-núcleos feminino e masculino, no qual, ambos migrarão para o centro do ooplasma onde ocorrerá a singamia e a primeira divisão mitótica (Gordon, 2003; Gonçalves et al., 2008).

O cultivo in vitro (CIV) baseia-se no desenvolvimento embrionário após a singamia seguindo das primeiras divisões mitóticas, ativação do genoma embrionário, o qual se inicia no estágio de oito a dezesseis células, compactação dos blastômeros e diferenciação do trofoblasto e embrioblasto, desenvolvimento da blastocele até a formação do blastocisto expandido (Gordon, 2003)

Para que os embriões se desenvolvam a termo, é importante que os meios de cultivos proporcionem todos os nutrientes necessários e o ambiente de cultivo seja adequado. A avaliação da PIVE ocorre no sétimo dia de cultivo, onde os blastocistos podem ser transferidos para vacas receptoras ou então criopreservados (Vargo et al., 2008; Gonçalves et al., 2008).

Entre os métodos de criopreservação embrionária, destaca-se o procedimento de vitrificação, em que ela consiste em erradicar os danos celulares causados pela formação de cristais de gelos. A técnica baseia-se no uso de altas concentrações de

crioprotetores que ocasionarão um aumento da viscosidade dos líquidos seguido um rápido resfriamento do embrião a -196 ºC em nitrogênio líquido, o que promoverá a solidificação dos líquidos gerando um estado vítreo e amorfo (Vajta; Nagy, 2006). Estudo realizado por Van Huong et al. (2018), mostra que as taxas gestacionais nos dias 35, 60 e 90 de receptoras de embriões desenvolvidos *in vitro e* criopreservados pela técnica de vitrificação e receptoras de embriões desenvolvidos *in vitro* sem o procedimento de criopreservação foram semelhantes, destacando assim a eficácia do método.

Sabe-se que mesmo diante de tantas pesquisas na área da PIVE, visando o aumento das taxas de produção, em média 78% dos oócitos coletados, maturados e fertilizados *in* vitro conseguem realizar a clivagem e, destes, apenas de 40 a 50% dos chegam ao estágio de blastocisto (Rizoz et al., 2002). Deste modo, as taxas de produção e criopreservação estão fortemente ligadas ao meio de cultivo embrionário, pois é sabido que os embriões produzidos *in vitro* divergem da expressão gênica de embriões produzidos *in vivo* (Lee et al., 2001; Niemann; Wrenzycki, 2000), bem como morfologia (LazzarI et al., 2002), tempo de desenvolvimento (Van Soom et al., 1997) e metabolismo embrionário (Khurana; Niemann, 2000).

2.2 Fontes proteicas utilizadas para PIVE

Para que se estabeleça uma produção de sucesso, os meios de cultivo embrionários contam com proteínas exógenas que estimulam a proliferação celular, bem como o subsequente desenvolvimento deles, além disso, a adição dessas fontes proteicas influencia na morfologia e metabolismo embrionário. As principais macromoléculas utilizadas são o Soro Fetal Bovino e a Albumina Sérica Bovina (Carolan et al., 1994 Bavister,1995; Wang et al., 1997).

O Soro Fetal Bovino (SFB) é uma macromolécula utilizada como fonte proteica em meios de MIV e CIV. Sua utilização vem sendo estudada durante muitos anos (Van Langerdonckt et al., 1996; Tricoire; Touzé; Mermillod, 1999). Este constituinte possui um conjunto de componentes estruturais como hormônio, fatores de crescimento,

aminoácidos, citoquinas e vitaminas que podem ser benéficos para o desenvolvimento embrionário, contudo, o SFB é considerado um meio indefinido, podendo sua composição variar entre os lotes do produto (Tricoire; Touzé; Mermillod, 1999).

Esta macromolécula possui múltiplos suprimentos essenciais que favorecem o crescimento celular (Arigony et al. 2013). Por se tratar de um componente extraído biologicamente, o mesmo é amplamente utilizado em cultivos celulares tanto de animais como de humanos (Gstraunthaler 2003; Arigony 2013; Van Der Valk et al., 2018) e, aproximadamente 90 tipos de proteínas já foram identificadas através de estudo proteômico (Zheng et al., 2008).

Seu efeito diante da PIVE é considerado bifásico, pois inibe as primeiras clivagens e acelera o desenvolvimento pós-compactação estimulando que embriões evoluam ao estágio de blastocisto (Gordon, 2003) estando assim associado a taxas mais satisfatórias de produção embrionária (Leivas et al. 2011). Entretanto, sua utilização está ligada a um maior acúmulo lipídico citoplasmático nos embriões (Sudano et al., 2012), mesmo quando utilizado em baixas concentrações (Murillo et al., 2017), podendo isso ocorrer devido a absorção de lipoproteínas do soro (Abe; Hoshi, 2003), indução de neossíntese de triglicerídeos pelos embriões (revisado por Sudano et al., 2012) e alteração da atividade mitocondrial levando a maior armazenamento de lipídios intracelulares (Abe et al. 2002) e, consequentemente, dificultando criopreservação dos mesmos (Yroyuki et al., 2002; Gómez et al., 2008; Sudano et al., 2012).

Além do mais, a utilização do SFB está ligado à alteração na expressão de mRNAs de genes que levam a maiores taxas apoptóticas, diminuição na secreção de interferon tau (INF- τ) para reconhecimento materno, aumento do estresse oxidativo e alteração na diferenciação celular e implantação (Rizoz et al., 2003), sendo também responsável por diminuição das junções intercelulares (Mohr; Trounson, 1981), maior fragilidade da zona pelúcida (Leibo; Loskutoff, 1993), bem como a Síndrome da Grande Prole quando utilizado em altas concentrações (Lazzari et al.,2002).

No entanto, é sabido que as proteínas são componentes importantes para o desenvolvimento embrionário, pois através delas é que serão originadas as estruturas celulares. Os embriões absorvem as proteínas presentes no meio através da endocitose, com o intuito de manter os níveis de aminoácidos intracelulares para seu

sucessivo desenvolvimento, sendo que o cultivo realizado na ausência das proteínas pode proporcionar degradação de proteínas endógenas do embrião (Thompson et al., 1998). Em bovinos, a principal influência dessas moléculas é notada na fase de pós-compactação embrionária, em que a ausência das macromoléculas é prejudicial para o desenvolvimento dos mesmos (Krisher; Lane; Bavister, 1999; Duque et al., 2003; Orsi e Leese, 2004), pois é nesse segundo estágio, que os embriões mais necessitam (Thompson et al., 1998), visto que a ausência das proteínas no meio de CIV resulta na redução do desenvolvimento embrionário e redução da massa celular interna (Muríllo-Rios et al.,2017).

A presença do SFB nos meios de cultivo é frequente e leva a maiores taxas de PIVE (Wang et al., 1997). Quando o cultivo é realizado com a presença de SFB, há uma maior produção de blastocistos e maior taxa de expansão deles no sétimo dia de CIV. Quando comparado com grupos cultivados apenas com BSA, confirmando assim, o seu efeito bifásico o qual acelera o desenvolvimento de mórula para blastocisto. Os grupos tratados com SFB também alcançam maior taxa de reexpansão e eclosão, após 24h de descongelamento, pressupondo-se uma maior qualidade dos mesmos (Senna-Netto et al., 2020). Todavia, a utilização do SFB no cultivo resulta em uma menor quantidade das células da massa celular interna (MCI) do embrião (Garcia et al., 2015).

A albumina sérica bovina (BSA) é a proteína mais abundante encontrada no organismo bovino, sendo que ela é a principal do soro e corresponde a 60% da proteína total. Essa proteína pode ser encontrada na corrente circulatória como no espaço extra vascular, onde proporciona diversos benefícios para as células (Ellmerer et al. 2000).Entre as funcionalidades fisiológicas que essa proteína desenvolve destaca-se o transporte de estruturas como ácidos graxos, íons metálicos, aminoácidos e, também, suas funções antioxidantes (Francis, 2010).

É sabido que o processo de PIVE pode resultar na formação de danos oxidativos às células, reduzindo consequentemente a viabilidade embrionária Zhang et al, 2016). A BSA é constituída por 583 aminoácidos (Peters Jr, 1995) e seu potencial de ação antioxidante se dá pelos aminoácidos cisteína, a qual tem a função de eliminar os radicais livres produzidos que ocasionarão lesões celulares e pela metionina que

irá atuar como quelante de metais evitando assim a posterior geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (Guedes et al. 2009).

Como descrito anteriormente, para o SFB, a BSA também é conduzida para o meio intracelular, através da endocitose (Pemble e Kaye, 1976), onde a macromolécula será hidrolisada e aumentará o "*pool"* de aminoácidos disponíveis que serão metabolizados pelas vias energéticas do embrião (Orsi e Leese, 2004), além do mais, é provável que a BSA sirva como uma fonte abundantemente nutritiva, sendo utilizada, principalmente, no estágio pós compactação (Thompson, 2000).

Quando removido o SFB da MIV e da CIV Korhonen et al. (2010), observou-se que a substituição por BSA desencadeia um atraso no desenvolvimento embrionário, menor número de embriões e a redução no número de células das estruturas. Isso ocasionado pela privação de proteínas e fatores de crescimento presentes no SFB. Senna-Netto et al. (2020) demostraram em seu trabalho que o uso isolado da BSA como fonte proteica na MIV e na CIV afeta negativamente o desenvolvimento e a competência embrionária e não melhora as taxas de resistência pós criopreservação, demonstrando, assim, que a substituição do SFB por BSA é ineficaz, concluindo que os benefícios da utilização isolada da albumina ainda não são completamente esclarecidos.

Entretanto, a aplicação dessas macromoléculas, quando associadas, estão relacionadas a uma maior produção de blastocistos, bem como uma melhor qualidade, sendo que a utilização de 2% de SFB junto com a BSA pode apresentar rendimentos de aproximadamente 10% na PIVE, quando comparado com a utilização das mesmas isoladas (Leivas et al., 2011).

2.3 Metabolismo Embrionário e Fontes Energéticas

Para que o desenvolvimento embrionário inicial decorra perfeitamente é crucial a geração de energia pelo mesmo através de oxidação de nutrientes por meio das vias metabólicas celulares. O período de pré-compactação e compactação diferem nas necessidades energéticas, sendo isso umas das principais influências sobre a

viabilidade embrionária, pois a disponibilidade de nutrientes ofertados *in vitro*, exercem grande atuação nas características fenotípicas dos fetos (Gardner, 1998, Gopichandran; Leese, 2003;).

Durante os processos de clivagem inicial até a ativação do genoma embrionário a metabolização é relativamente baixa, o embrião, utiliza suas reservas energéticas, oriundas do oócito, para suprir suas exigências (Ferguson; Leese, 1999), podendo ter também o consumo de piruvato, lactato aminoácidos e pequenas quantidades de glicose até o estágio de 16 células (Khurana; Niemann, 2000). Ao passo que sucede o subsequente desenvolvimento e se dá a completa ativação do genoma embrionário, ocorre um aumento nas necessidades de Adenosina Trifosfato (ATP), que está correlacionado à biossíntese da clivagem celular e a energia requerida para que transcorra a formação e expansão da blastocele (Gardner; Harvey, 2015).

A incapacidade de o embrião em estágio de clivagem utilizar a glicose como fonte principal de energia, se dá pela elevada relação ATP:ADP (Leese et al., 1984), em que ocorre baixa criação de energia no momento da pré-compactação. Essa alta correlação (ATP:ADP) inibe o fluxo de glicose através da enzima Fosfofrutokinase (PKF), limitando, assim, a utilização da glicose através da via glicolítica antes da compactação (Barbehenn; Wales; Lowri, 1974). *In vivo*, quando o embrião está no oviduto ele encontra-se em uma concentração relativamente elevada de piruvato (0,32 mM) e lactato (10,5 mM), utilizando esses como fonte primária de energia nesse estágio, e baixa concentrações de glicose (0,5 mM) (Gardner et al., 1996). Essa biodisponibilidade de nutrientes impacta as vias metabólicas e sintetizantes do embrião, sendo que a razão piruvato:lactato no ambiente em que o embrião está, afeta diretamente a proporção NADH:NAD+, o qual por sua vez regula o estado redox das células (Lane; Gardner, 2000).

A blastulação dá início, a partir do estágio de 32 células e está inteiramente correlacionada com a atividade da bomba de Na+/K+, sendo que esta, por sua vez, levará ao influxo de água para dentro do embrião devido aos micros lúmens, formados pela exocitose de vesículas de membrana e, aumentará a osmolaridade, ocorrendo assim a formação da blastocele (Alcron; Marikawa, 2018). Durante os dias sete e oito do cultivo cerca de 36% e 15%, respectivamente, da energia metabolizada pelo blastocisto é utilizada pela bomba de Na+/K+ (Houghton et al., 2003).

Conforme há a formação do blastocisto, as necessidades por O_2 e glicose vão aumentando no embrião, sendo que o aumento no consumo de O_2 se dá pela necessidade do embrião em formar e manter a blastocele, e o uso da glicose dá-se pelo aumento da proliferação celular (Gardner 1998). Quando isso acontece, há uma redução na relação ATP:ADP e elevação dos níveis de Adenosina monofosfato (AMP), sinalizando baixa energia para a enzima PKF, consequentemente, sendo facilitado o uso da glicose pela glicólise (Leese et al., 1984). A via glicolítica no embrião além de suprir necessidades energéticas, também desenvolve um papel relevante na biossintese de triglicerídeos, fosfolipídeos e glicoproteinas, sendo esses importantes constituintes celulares. Quando metabolizada pela via das Pentoses Fosfato (PPP) a mesma origina as riboses que darão origem aos RNAs, DNAs e NADH,sendo que este último atua como redutor da glutationa, um influente antioxidante fisiológico (Garner; Leese, 1990; Gardner, 1998).

Da glicose metabolizada pelo blastocisto, metade é convertida em lactato, mesmo com quantidades de O_2 suficientes para suportar oxidação completa. Esse lactato metabolizado é transferido para o ambiente através dos transportadores de Ácido Monocarboxilícos, criando um microambiente em torno do embrião caracterizado por alto lactato (Garner; Leese, 1990), sendo que isso *in vivo,* facilitará o processo de implantação que ajudará na degradação do tecido uterino promovendo a invasão do trofoblasto (Garner, 2015). Mesmo que a glicose seja o nutriente principal do blastocisto, a ausência da glicose, faz com que o embrião eleve a absorção de piruvato, oriundo do alto lactato, para suprir suas demandas, sendo que o mesmo, também, atua como antioxidante (O'Fallon; Wright Jr., 1996).

O piruvato proveniente da glicólise e do lactato, será oxidado pelas mitocondrias através do Ciclo do Ácido Tricarboxilico (TCA) em energia, tendo uma produção final de 34 ATPs. Sendo assim, pode-se perceber que os embriões migram de um metabolismo de baixa energia em seus estágios iniciais (pré-compactação) para um metabolismo de alta energia sendo sustentado energéticamente em seu estágio de pós-compactação pela glicólise e, também, pela fosforilação oxidativa (Lane; Gardner, 1996; Houghton; Leese, 2004).

2.3.1 Metabolismo da glicose

A glicose é o principal combustível para o metabolismo celular, sendo capaz de suprir uma vasta necessidade de metabólitos energéticos para a biossíntese de novos tecidos. A molécula entra nos embriões através da difusão facilitada por intermédio das proteínas transportadoras de glicose (GLUTs), uma vez dentro do citoplasma, a mesma pode ser metabolizada em três átomos de carbono, gerando piruvato, pela via glicolítica, tendo o propósito de produzir ATP, ou então ser oxidada pela das pentoses-fosfato (PPP) produzindo ribose-5-fosfato e NADPH (Nelson; Cox, 2019).

2.3.1.1 Glicólise

Neste processo de metabolização, a glicose será degradada em uma sequência de dez catalizações enzimáticas, que ocorrerão no citosol celular, tendo como produto final duas moléculas de piruvato e, durante as reações, a energia livre da glicose será armazenada na forma de ATP e NADH (Figura 1).

A primeira fase da glicólise é chamada de fase de investimento e tem por objetivo a preparação da glicose para produção de ATP, nesta fase haverá também o gasto de dois ATPs para a fosforilação dos compostos orgânicos. Com a entrada da glicose na célula, ela será fosforilada inicialmente em D-glicose-6-fosfato pela enzima hexocinase, tendo como intuito evitar o retorno para o espaço extracelular. A reação subsequente ocorrerá através da enzima fosfo-hexose-isomerase originando a Frutose-6-fosfato, seguido de Frutose 1,6-bifosfato sendo esta, por sua vez, catalisada até gliceraldeído-3-fosfato (Devlin, 2010).

A segunda fase é denominada fase de pagamento e engloba as etapas de fosforilação que sintetizarão a energia em ATP e NADH. Apesar de a formação final da glicólise ter uma produção de quatro ATPs, no entanto, seu rendimento líquido é de apenas duas moléculas, pois outras duas já foram gastas na fase preparatória (Voet; Voet, 2010).

As estruturas do gliceraldeído-3-fosfato são oxidadas e fosforiladas em duas estruturas de 1,3-bifosfoglicerato, sendo que, assim que esta última molécula é

convertida em duas moléculas de piruvato ocorre a liberação de energia em forma de ATP. Essas duas moléculas de piruvato formadas a partir de uma molécula de glicose podem seguir dois caminhos, sendo eles a via anaeróbica e produção de lactato, ou a via aeróbica e sua subsequente oxidação em um grupo acetil que será completamente oxidado no ciclo do ácido tricarboxilico (Voet; Voet, 2010; Devlin, 2010).

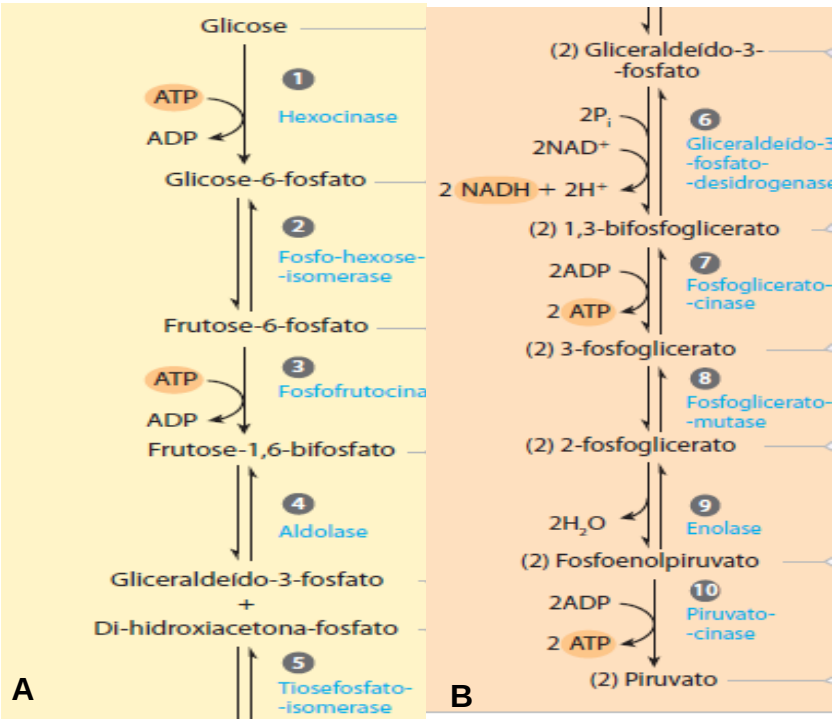

Figura 1. Fases da glicose. Fase de investimento (A) e fase de pagamento (B) (Nelson; Cox, 2019).

2.3.1.2 Via das pentoses-fosfato

Apesar de na maioria dos tecidos a glicose ser catabolizada prioritariamente pela via glicolítica, a glicose-6-fosfato também pode ser degradada pela via das Pentoses-fosfato, a qual dará origem a produtos específicos para uso celular (Figura 2).

Tecidos que estão em constante e rápida divisão utilizam a via das pentoses para produzir DNA, RNA, NADH, ATP, entre outros componentes importantes para a formação e estruturação celular. A glicose-6-fosfato é necessitada tanto pela via glicolítica como pela via das pentoses, o que estabelece a entrada nela na via das pentoses é a necessidade e a disponibilidade de $NADP^+$ no citoplasma celular (Fernie; Carrari, Sweetlove., 2004). Quando há a ausência de $NADP^+$ a primeira oxidação da via das pentoses não pode dar continuidade, entretanto, quando a célula está convertendo rapidamente NADPH em $NADP^+$ devido a biossíntese tecidual, a quantidade de $NADP^+$ é elevada e, consequentemente, aumentando o fluxo de glicose-6-fosfato pela via das pentoses. Todavia, quando a exigência por NADPH é reduzida, os níveis de $NADP^+$ diminuem, de modo que, a velocidade da via das pentoses diminui e a glicose é utilizada pela via glicolítica (Voet; Voet, 2010; Nelson; Cox, 2019).

O início da metabolização por via das pentoses se dá com a oxidação da glicose e essa fase é chamada de oxidativa. A glicose-6-fosfato é oxidada reduzindo $NADP^+$ em NADPH e dá origem a ribulose-5-fosfato a qual será convertida em ribose-5-fosfato.

O NADPH gerado nessa fase é utilizado para reduzir a glutationa (GSH) a partir da glutationa oxidada (GSSG), e é um componente essencial para diminuir ou reverter os danos causados por estresse oxidativo nas células, a ribose -5-fosfato por sua vez, será precursora de ácidos nucleicos, nucleotídeos e coenzimas (Nelson; Cox, 2019).

A segunda fase é denominada de não oxidativa e ocorre principalmente em tecidos que necessitam especialmente de NADPH. As riboses-5-fosfato que são produzidas pelo ciclo serão recicladas pelas enzimas transcetolase e transaldolase levando a regeneração da glicose-6-fosfato, que proporcionará a produção constante de NADPH (Fernie; Carrari; Sweetlove, 2004).

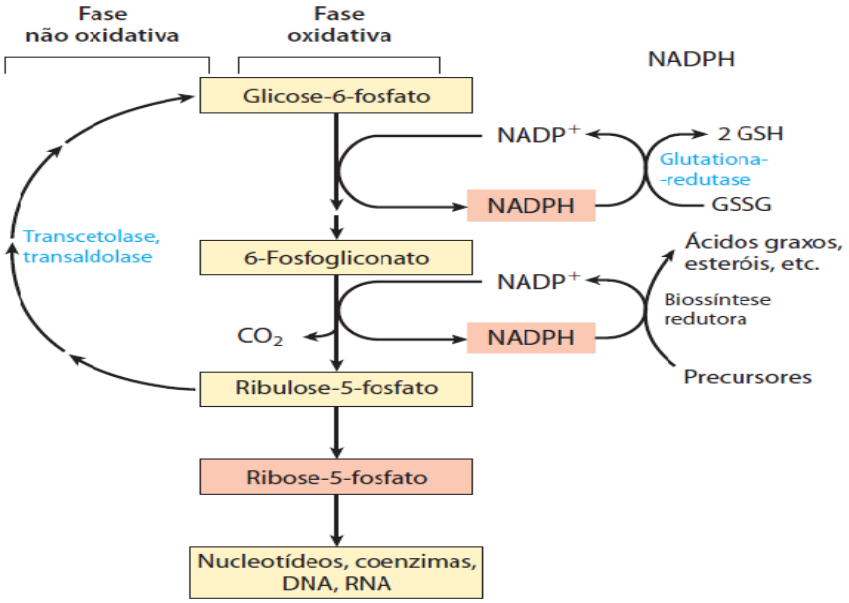

Figura 2. Via das pentoses fosfato (Nelson; Cox, 2019).

2.3.2 Metabolismo do piruvato

O piruvato tem dois caminhos que podem metabolizá-lo, sendo eles a via anaeróbica e aeróbica. Em condições de baixa oxigenação o NADH originado da glicólise não pode ser reoxidado, e a falha na regeneração NAD^+ cessaria as etapas energéticas da glicólise, desse modo, a progressão da regeneração do NAD^+ em condições anaeróbicas ocorre pela transferência de elétrons do NADH para dar origem ao lactato. A redução de piruvato para lactato através da transferência de elétrons, ocorre pela enzima Lactato-desidrogenase (Marzzoco; Torres, 2007; Devlin, 2010).

Segundo Fernie; Carrari; Sweetlove (2004), em presença de O_2, o piruvato difunde-se pela membrana mitocondrial e é oxidado na matriz mitocondrial pela enzima Piruvato-desidrogenase. A reação originada pela enzima é irreversível e sucede com a remoção da molécula de CO_2 do piruvato, em que ele será convertido em um grupo acetil da acetil-CoA e será metabolizado no ciclo do ácido cítrico.

2.3.3 Metabolismo dos ácidos graxos

Os ácidos graxos são estruturas necessárias para a formação celular, estima-se que a maioria dos lipídeos que compõe os embriões são triglicerói̇s (Ferguson e Leese,1999; McEvoy et al., 2000), sendo que esses chegam a representar de 40 a 50% da constituição lipídica total de embriões produzidos *in vivo* podendo chegar a 88% em embriões oriundos de técnicas *in vitro* (revisado por Pereira et al., 2008). Além de serem uma excelente fonte energética, também são fontes para produção de sinalizadores celulares, síntese de hormônios e são bases das organelas celulares e membranas plasmáticas (Dunning; Russel; Robker, 2014), (Figura 3).

As enzimas que realizam as oxidações dos ácidos graxos encontram-se na matriz mitocondrial e, ácidos graxos que possuem estruturas até 12 carbonos tem livre passagem pela membrana, entretanto, estruturas acima de 14 carbonos necessitam de transportadores de membrana sendo o principal deles o complexo acil-carnitina/carnitina o qual é sintetizado, principalmente, no fígado através da metabolização dos aminoácidos lisina e metionina (Mishra et al., 2016).

O complexo acil-carnitina/carnitina transforma esse ácido graxo em um grupo acil-CoA, sendo que a membrana mitocondrial é impermeável a esse composto, por sua vez, irá se acoplar à carnitina, liberando assim a conenzima A tendo imediata entrada na matriz mitocondrial. Dentro da mesma, a carnitina irá ligar o grupo acil a uma nova molécula de coa. A carnitina livre volta para o citoplasma através do seu transportador (Devlin, 2010).

Uma vez dentro da matriz mitocondrial, a oxidação dos ácidos graxos ocorre em três etapas. A primeira fase é chamada de β-oxidação onde a mesma remove, oxidativamente, consecutivas unidades de dois carbonos em forma de acetil-CoA. A segunda etapa é a destinação dessa acetil-CoA para a degradação no ciclo do ácido cítrico, em que ela entrará em uma via comum de oxidação juntamente com a acetil-CoA originada da metabolização da glicose e do piruvato. A terceira e última etapa, é a doação dos elétrons produzidos para a cadeia respiratória mitocondrial (Devlin, 2010; Nelson; Cox, 2019).

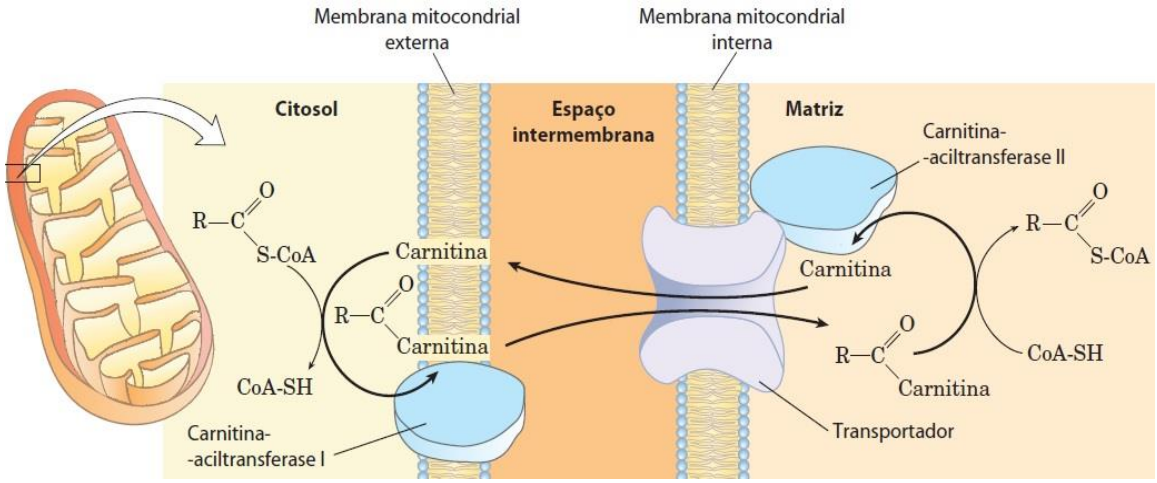

Figura 3. Entrada dos ácidos graxos na matriz mitocondrial através do complexo acil-carnitina (Nelson; Cox, 2019).

2.3.4 Metabolismo dos aminoácidos

Os aminoácidos utilizados pelo metabolismo embrionário durante seu desenvolvimento são oriundos das secreções dos fluídos do trato reprodutivo (Bavister, 1995). Na produção *in vitro* foi observada uma melhora significativa no desenvolvimento embrionário quando o meio de cultivo foi acrescido com aminoácidos, sendo que esses podem ser importantes estimuladores da evolução embrionária (Takashi; First 1992; Kim et al. 1993), (Figura 4).

As principais fases da degradação desses compostos é a desaminação, a partir da retirada do grupo amina, tendo por subsequente a fase de formação dos esqueletos de carbono, que sofrerão oxidação, formando constituintes (acetil-CoA, α-cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato, oxalacetato e piruvato) capazes de serem degradados no ciclo do ácido cítrico (Voet; Voet, 2010).

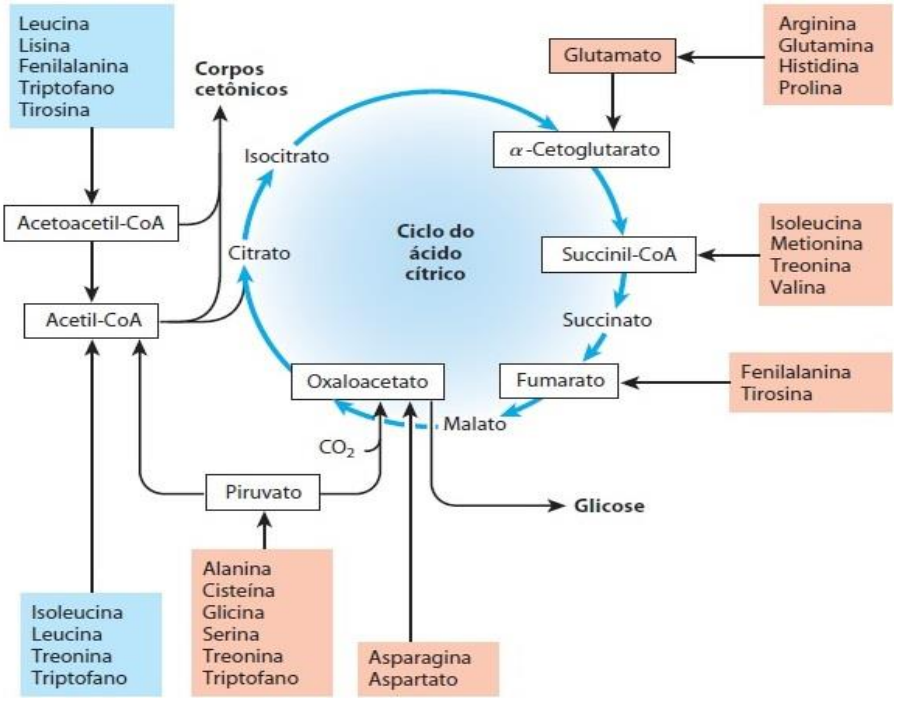

Figura 4. Degradação dos aminoácidos e formação de compostos do ciclo do ácido cítrico (Nelson; Cox, 2019).

2.3.5 Ciclo do ácido cítrico e cadeia respiratória mitocondrial

O ciclo do ácido cítrico (TCA) é uma via universal catabólica, que ocorre na matriz mitocondrial e degrada compostos originados da metabolização de gorduras, proteínas e carboidratos à CO_2 (Marzzoco; Torres, 2007), (Figura 5).

O ciclo tem início com a doação do grupo acetila da acetil-CoA para o oxalacetato através da enzima citrato-sintase, tendo assim a formação do citrato, este por sua vez, através da enzima aconitase é transformado em isocitrato. O isocitrato sofre uma descarboxilação através da enzima isocitrato-desidrogenase produzindo α-cetoglutarato (Fernie; Carrari; Sweetlove, 2004).

A α-cetoglutarato por sua vez, também sofre uma descarboxilação pelo complexo da α-cetoglutarato-desidrogenase, originando assim, o composto succinil-CoA, sendo que este, por sua vez, é convertido em succinato pela enzima succinil-CoA-sintase. O succinato é oxidado pela succinato-desidrogenase em fumarato, em

que a fumarase irá hidratar este composto o transformando em malato. Findando o ciclo, sua última reação ocorre através da oxidação de malato a oxalacetato pela L-malato-desidrogenase (Voet; Voet, 2010; Nelson; Cox, 2019).

Para cada molécula de acetil-CoA que entra no TCA e é oxidada, a energia resultante é de três moléculas de NADH, uma de $FADH_2$ e um ATP.

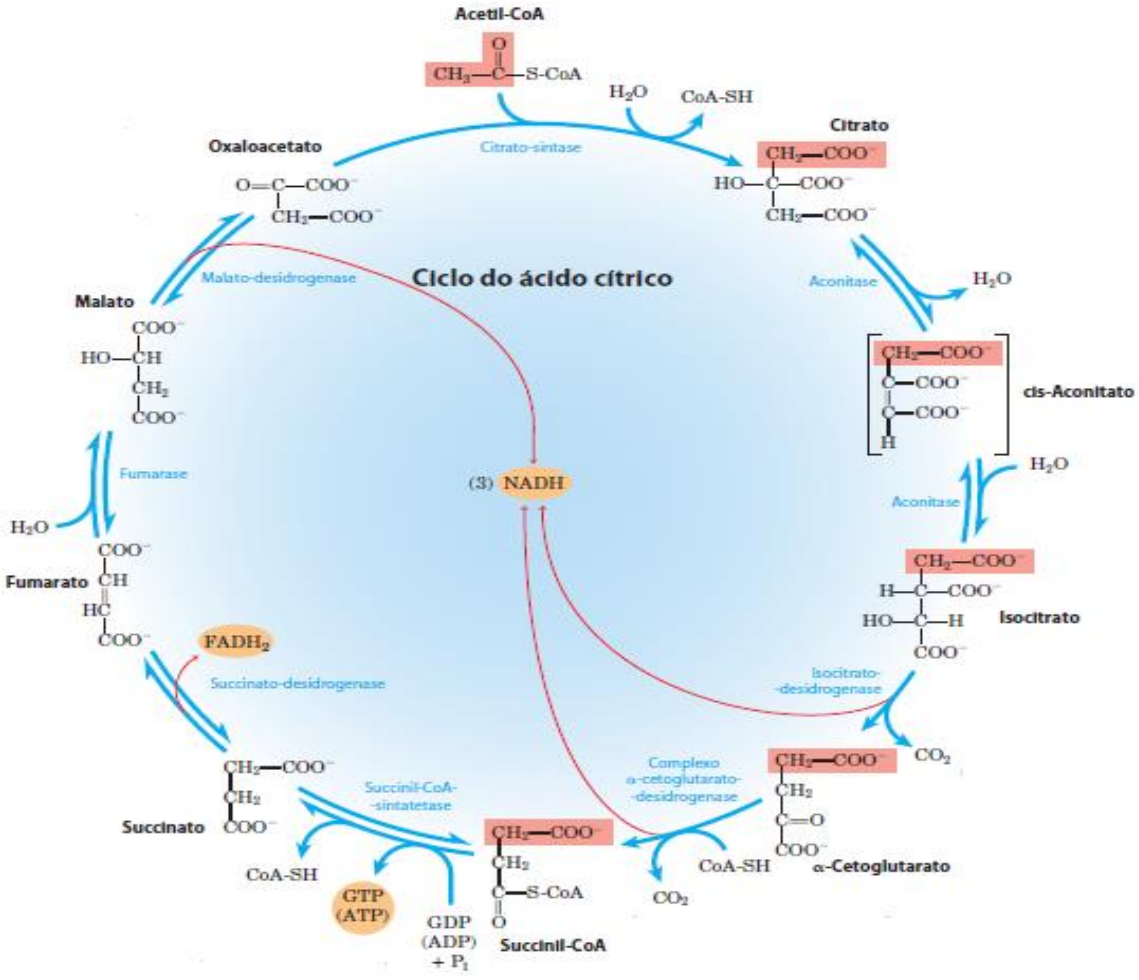

Figura 5. Reações do ciclo do ácido cítrico (Nelson; Cox, 2019).

Na cadeia respiratória mitocondrial, a energia resultante da oxidação do TCA dá início à fosforilação oxidativa através da entrada dos elétrons em uma série de transportadores específicos conhecida como cadeia respiratória. Os principais carreadores de elétrons são o NADH, sendo esse o principal em reações catabólicas, e o NADPH, o qual geralmente fornece elétrons para reações anabólicas, sendo que

nenhum desses carreadores conseguem transpassar a membrana, apenas os elétrons através de receptores específicos. As flavoproteínas também são carreadores de elétrons (FAD), sendo que podem transferir um ou dois elétrons ($FADH_2$) (Fernie; Carrari; Sweetlove, 2004; Devlin, 2010).

A cadeia transportadora de elétrons é constituída por um complexo de quatro carreadores que se localizam na membrana interna mitocondrial. O NADH transfere seu íon hidreto para o Complexo I e o $FADH_2$ Complexo II, esses complexos entregaram o íon para a ubiquinona também conhecida como Q10, esta por sua vez irá ser reduzida para QH_2 e levará os íons para o Complexo III ocorrendo a liberação de dois elétrons que serão entregues ao Citocromo C. O Citocromo C carreará os elétrons do para o Complexo IV, onde o último grupo de íons será bombeado, o último complexo carregará os elétrons para o O_2, tendo subsequente formação de H_2O. Com essa troca de prótons e elétrons a membrana interna mitocondrial ficará com carga negativa e o espaço intermembrana com carga positiva (Marzzoco; Torres, 2007; Nelson; Cox, 2019).

Essa diferença de cargas entre os espaços, faz com que os H^+ voltem a parte interna da mitocôndria através do complexo proteico ATP-sintase, a qual também formará a produção de ATP através do composto ADP+ P_i (Figura 6).

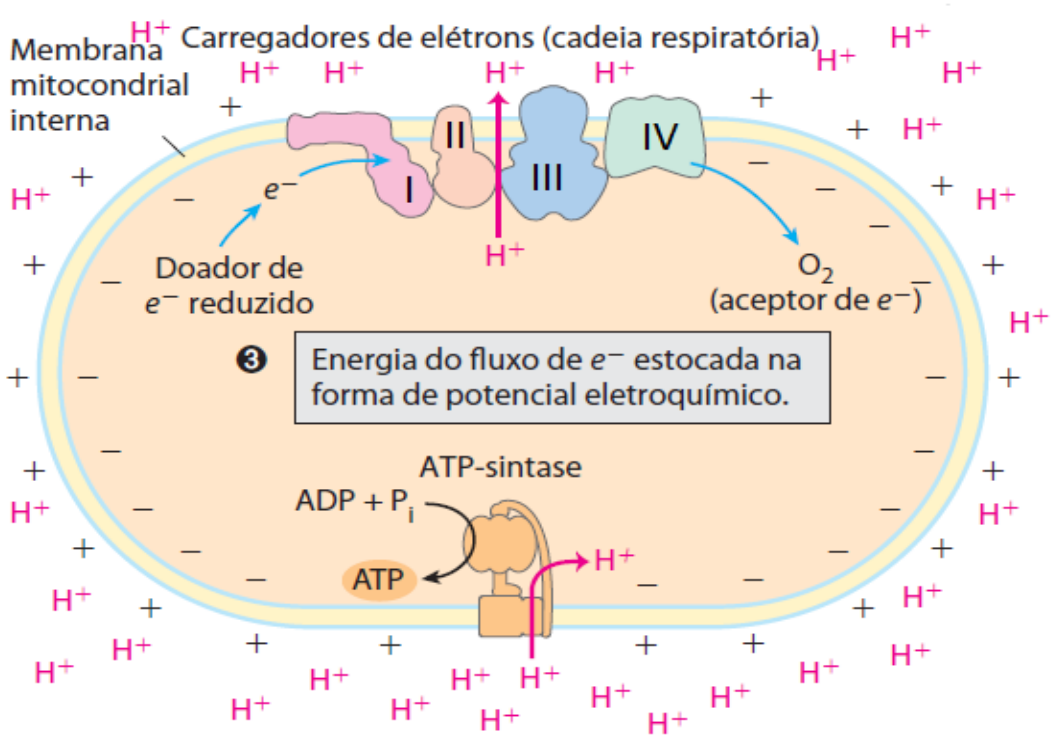

Figura 6. Esquema da fosforilação oxidativa e síntese de ATP (Nelson; Cox, 2019).

2.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um processo fisiológico do organismo e ocorre quando a célula tem um acúmulo excessivo de EROs (espécies reativas de oxigênio). As EROs são geradas naturalmente durante o metabolismo mitocondrial em condições aeróbicas e, quando em equilíbrio, elas são benéficas ao organismo e atuam como sinalizadores da regeneração tecidual, condições de estresse celular principalmente em embriões e na síntese e degradação de hormônios (Guérin; Mouatassim; Ménézo, 200, Luberda, 2005), (Figura 7).

Quando há um desequilíbrio na produção de EROs ocorrem danos oxidativos, principalmente, nas proteínas mitocondriais, DNA e em suas membranas o que permite a entrada de pequenas moléculas no interior da mesma. Consequentemente, estes danos, impedem que a organela exerça sua função perfeitamente, acarretando falhas para sintetizar ATP, metabolizar aminoácidos, ácidos graxos e no TCA,

podendo ocorrer, também, o desencadeamento da apoptose celular (Murphy, 2009; Guérin; Mouatassim; Ménézo, 2001).

As EROs têm origem quando há um desequilíbrio de íons, ou seja, há mais elétrons disponíveis para entrar na cadeia respiratória do que o número de H^+ que podem ser passados para o O_2 (Nelson; Cox, 2019). A molécula de O_2 deve receber quatro elétrons para que possa dar origem a duas moléculas de H_2O, se ocorrer de receber apenas um H^+ formará o radical superóxido (O_2^-). Para tentar evitar os danos causados pelo superóxido, o organismo utiliza a enzima superóxido-dismutase, originando peróxido de hidrogênio (H_2O_2), este por sua vez é altamente reativo ao ferro e ocorrerá a formação do radical hidroxila (OH^-), sendo considerado o mais danoso (Murphy 2008; Guérin; Mouatassim; Ménézo, 2001). Para se tornarem estáveis, as mesmas precisam reagir com demais estruturas do organismo para adquirir elétrons, deste modo, lesam diversas estruturas celulares irreversivelmente (Agarwa; Gupta; Sharma, 2005).

É conhecido que a PIVE é um fator significativo na produção de EROs, principalmente quando as estruturas são cultivadas em concentrações atmosféricas de O_2, sendo que esta é de três a quatro vezes maior que as concentrações do oviduto (3-9%) e útero (Mastroianni e Jones, 1965). Pelo fato de os embriões serem sensíveis aos danos causados pelas EROs, podem interromper seu desenvolvimento permanentemente após a ativação do genoma embrionário (Bavister, 2000). Quando as concentrações de O_2 foram testadas, foi observado que embriões de vacas e ovelhas se desenvolveram melhor em concentrações inferiores do que atmosférica, resultando em um maior número de células embrionárias (Thompson et al. 1990) e um menor número de células apoptóticas (Van Soom et al., 2002).

Por mais que os embriões possuem genes e mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo, os mesmos não são expressos até o estágio de pré-implantação (Harvey et al. 1995), sendo que o acúmulo de EROs durante o início do cultivo *in vitro*, podem sobrecarregar os mecanismos de defesa embrionário, quando eles são cultivados em concentrações de 20% de O_2, gerando uma desregulação celular e induzindo apoptose (Guérin; Mouatassim; Ménézo, 2001). Ademais, embriões ovinos oriundos de PIVE, cultivados em 5% de O_2 apresentaram maior número de mórulas e blastocistos, produziram menores taxas de EROs, bem como uma maior expressão

de genes relacionados ao metabolismo antioxidante e da glicose (Kumar et al., 2020) Em embriões suínos a baixa concentração de O_2 reduziu a produção de H_2O_2 e a fragmentação do DNA (Kitagawa et al.,2004), enquanto que, em embriões bovinos a alta tensão de O_2 afetou a remodelação de histonas, relacionada ao silenciamento de genes (Gaspar et al., 2015).

Um dos sistemas fisiológicos de defesa celular é por ação da glutationa (GSH), esta estrutura é um tripeptídio originado a partir dos aminoácidos cisteína, glicina e glutamato que está vastamente distribuída nos tecidos do organismo e atua como importante agente redutor contribuindo contra o estresse oxidativo (Luberda, 2005).

A glutationa encontra-se nas células em forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), esse ciclo de oxidação e oxirredução conta com duas enzimas importantes que catalisam as reduções, a glutationa-peroxidase (GPx) que atua utilizando o selênio e, a glutationa-redutase (Gr) a qual utiliza o NADPH. A glutationa-peroxidase realiza a dismutação do H_2O_2 em H_2O utilizando a glutationa em sua forma reduzida que consequentemente ficará na sua forma oxidada. A ação da glutationa-redutase será de regenerar a forma da glutationa reduzida para forma de oxidada, utilizando elétrons do NADPH (Meister; Anderson,1983; Hall, 1999; Luberda, 2005).

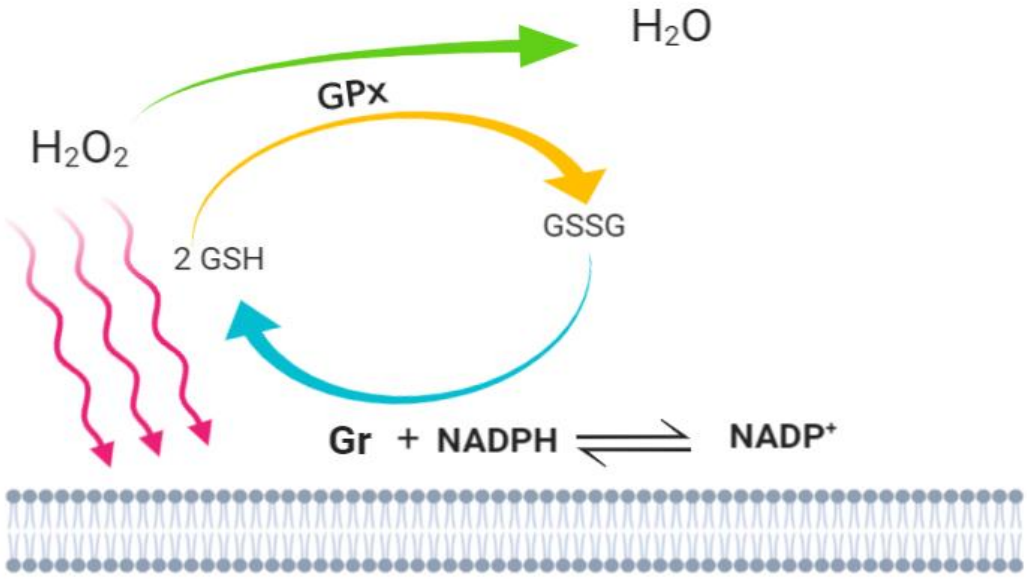

Figura 7. Defesa celular contra EROs utilizando glutationa (Fonte: a autora).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os materiais utilizados no experimento foram adquiridos da Sigma-Aldrich (San Louis, MO, EUA). Produtos que não foram oriundos da marca serão detalhadamente descritos.

3.1 Local de experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Produção *In Vitro* de Embriões do Departamento de Patobiologia, Reprodução e Saúde Única da Faculdade de Ciências Agrárias e Zootécnicas (FCAV) da Universidade Estadual Paulista - UNESP, campus de Jaboticabal – SP, durante o período de 2019 e 2020.

Os experimentos seguiram as diretrizes éticas em experimentação animal, aprovada pelo Comitê de Ética (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal – SP, Brasil (Protocolo nº 07886/19).

3.2 Delineamento experimental

No presente trabalho desenvolveu-se dois experimentos visando avaliar a interferência dos componentes energéticos presentes nos meios de cultivo embrionário, bem como a intervenção da atmosfera nesse mesmo estágio de desenvolvimento da produção *in vitro* de embriões bovinos. O delineamento foi realizado em um fatorial 2x3, ou seja, avaliação de dois meios de cultivo (SOFaaci tradicional e SOFaaci sequencial) e três atmosferas de controle de O_2 (5%, 12% e 20%).

O meio SOFaaci teve como base a composição descrita por Holm et al. (1999) e alteração das fontes energéticas e aminoácidos foram ajustadas conforme trabalho de Lane et al. (2003).

Durante a fase de desenvolvimento embrionário foram utilizados dois meios de cultivo sendo eles SOFaaci sequencial e SOFaaci tradicional, em que a composição deles está descrita na Tabela1 do item 3.7. Nos grupos experimentais do meio SOFaaci sequencial o cultivo embrionário iniciou (D1) com a Fase A do meio, sendo esta constituída para um metabolismo pré-compactação com baixo requerimento energético, no D4 e D5 do cultivo foi realizado a renovação dos meios de cultivo, com o objetivo de trocar o meio da fase A para o meio da fase B, sendo este composto por altos valores energéticos que são necessitados por embriões em estágio de pós-compactação. No sétimo dia de cultivo (D7) os mesmos foram vitrificados para avaliação da criotolerância e estresse oxidativo, avaliados a fresco para estresse oxidativo ou então fixados em paraformoldeido 4% para posterior análise de contagem celular total. Os grupos do SOFaaci tradicional passaram pelas mesmas etapas, entretanto no processo de renovação (D4 e D5) a composição do meio não era modificada (Figura 8).

Também durante o cultivo, avaliou-se a interação da atmosfera de oxigênio na PIVE. Após dividir os zigotos em grupos a serem cultivados em meio SOFaaci tradicional ou SOFaaci sequencial, os mesmos eram cultivados em condições de oxigênio controlada. Nessa etapa, comparamos a produção, qualidade; bem como estresse oxidativo em diferentes concentrações atmosféricas do cultivo embrionário, sendo elas 5% de O_2, 5% de CO_2, N_2 balanço, 12% de O_2, 6% de CO_2, N_2 balanço ou em ar (20% de O_2), 5% de CO_2, N_2 balanço.

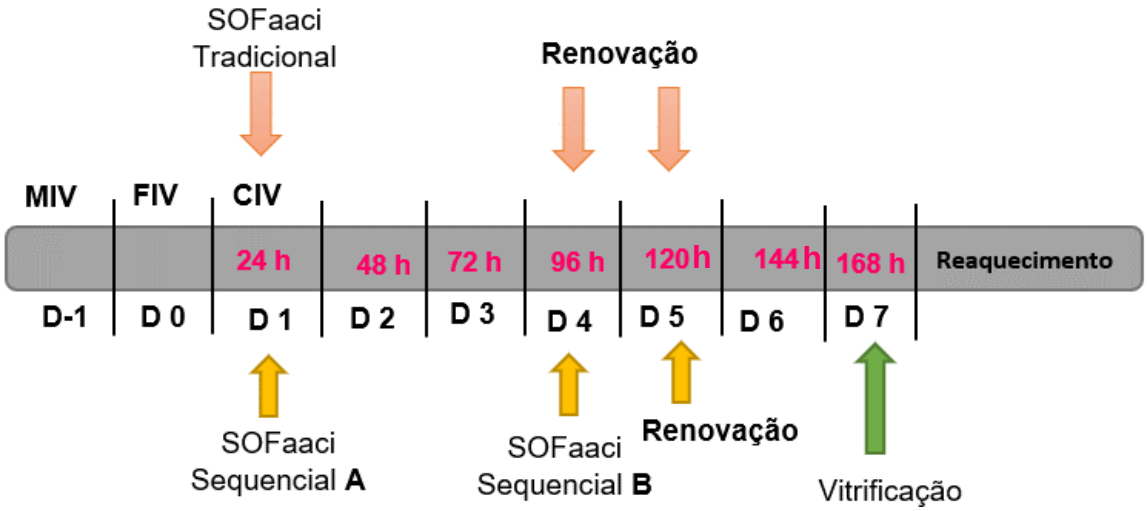

Figura 8. Esquema do delineamento experimental mostrando a troca dos meios de cultivo celular utilizados no experimento e o momento da vitrificação.

3.3 Obtenção dos oócitos

Os ovários utilizados no experimento, foram coletados no abatedouro municipal de Morro Agudo, SP e no frigorífico Minerva Foods em Barretos, SP. essesovários foram acondicionados em garrafas térmicas em uma temperatura próxima aos 35ºC. Ao chegar no laboratório o material era lavado com solução salina a 35ºC e acondicionados em um recipiente de vidro contendo solução salina e mantidos em banho maria à 37ºC.

Os oócitos foram coletados a partir da aspiração de folículos que mediam de 3 a 8 mm, utilizando agulhas 20G (Therumo Medical, SP, Brasil) acopladas em uma seringa de 10 mL, sendo que quando cheias, o conteúdo era depositado em um tubo de polipropileno modelo Falcon de 50 mL. Os tubos com o liquido folicular era mantido pré-aquecido juntamente ao banho maria, enquanto havia a sedimentação do mesmo. Ao término do processo de aspiração, os tubos foram levados ao laboratório de produção *in vitro* de embriões para a seleção dos oócitos.

3.4 Busca e seleção dos oócitos

O conteúdo sedimentado dos tubos foi coletado com uma pipeta de polietileno e transferido para uma placa de polipropileno de 90mm para a realização da procura dos complexos cumulus oócitos. A seleção e classificação dos mesmos foram em placas de poliestireno de 35mm sob estereomicroscopia, contendo meio TCM 199, suplementado com 5 mM de bicarbonato de sódio, 20 mM de HEPES, 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (CRIPION, Andradina, SP, BR), 0,2 mM de Piruvato de Sódio e 83,4 µg/mL de Sulfato de Amicacina (ABL – Antibióticos do Brasil, Cosmópolis, SP, Brasil). Sendo classificados quanto ao citoplasma e revestimento com células do cumulus conforme descrito por De Loos et al., (1991) sendo utilizado somente oócitos de grau I e II.

3.5 Maturação *in vitro* (MIV)

A maturação *in vitro* foi realizada em placas de 35 mm preparadas com microgotas de 100µL de meio de maturação, recobertas por 4mL de óleo mineral específico para cultivo celular.

O meio utilizado para a maturação in vitro dos oócitos foi TCM 199, acrescido com 26mM de Bicarbonato de Sódio, 10% de SFB (CRIPION, Andradina, SP, BR), 100 mM de Piruvato Sódico, 83,4µg/mL de Sulfato de Amicacina (ABL – Antibióticos do Brasil Ltda, Cosmópolis, SP, Brasil), 1,0µg /mL de FSH (FOLLTROPIN-V, Bioniche, Belleville, On, CA), 50UI/mL de hCG (Chorulon, MSD, AI), e 1,0µg/mL de Estradiol 17β.

Os oócitos selecionados foram lavados em duas gotas do meio de maturação e distribuídos nas gotas de 100 µL em grupos de 20 oócitos. As placas de maturação foram identificadas com data e etapa da PIVE e colocadas na incubadora de cultivo celular (Thermo Mod. 3110) 38,5ºC e 5% de CO_2 em ar e umidade relativa de 95%, por 24 horas, até a hora da fecundação.

3.6 Fertilização *in vitro* (FIV)

Antes da FIV os oócitos foram lavados por duas vezes no meio TL-Sêmen que foi preparado com 100 mM de Cloreto de sódio, 3mM de Cloreto de Potássio, 0,4 mM de Cloreto de Magnésio Hexa-hidratado, 0,3 mM de Fosfáto de Sódio Monobásico, 25 mM de Bicarbonato de Sódio, 2 mM de Cloreto de Cálcio Di-hidratado, 12 mM de DL-Ácido lático a 60%, 0,03 mM de Phenol Red e 10mM de HEPES Ácido e em duas gotas do meio FIV composto por suplementado com 100 mM de Cloreto de Sódio, 3mM de Cloreto de Potássio, 0,4 mM de Cloreto de Magnésio Hexa-hidratado, 0,3 mM de Fosfáto de Sódio Monobásico, 25 mM de Bicarbonato de Sódio, 2 mM de de Cloreto de Cál cio Di-hidratado, 12 mM de DL- Ácido lático, 0,03 mM de Phenol Red, 10 mM de HEPES Ácido, 83,4 µgm/L Sulfato de amicacina (ABL – Antibióticos do Brasil Ltda, Cosmópolis, SP, Brasil), 100 mM de Piruvato de Sódio, 18 µM de D- Penicilamina, 10 µM de Hipotaurina, 1,8 µM de Epinefrina, 176 UI/ mg de Heparina, 0,6 % de Albumina Sérica Bovina (BSA), para remoção do meio de maturação, posterior a isso, os oócitos maturados foram alocados em grupos de 25 em gotas de 100 µL de meio FIV, recobertas por óleo mineral.

Utilizou-se um o sêmen de um mesmo touro Nelore, sendo que foi empregada a mesma partida em todas as rotinas do experimento. O sêmen foi descongelado a 37ºC em banho maria durante 30 segundos. Posteriormente, o sêmen foi depositado em um microtubo de fundo cônico de 1,5mL contendo gradiente descontinuo de Percoll® (GE Healthcare, Uppsala, SW) a 45% e 90%. A primeira centrifugação foi realizada por sete minutos a uma força centrífuga de 3620g (450 rpm), ao término o sobrenadante foi removido e acrescentou-se 500µL de meio FIV. Sucedeu-se a segunda centrifugação por cinco minutos a uma força centrífuga de 80g (500 rpm). Em seguida, foi coletado 30µL do sedimento e colocados em outro microtubo de fundo cônico contendo 30µL de meio FIV previamente equilibrado.

Duas amostras de 5µL de sêmen foram coletadas e diluídas em 95µL do meio FIV em gotas para avaliação da motilidade e concentração, respectivamente. O volume do sedimento foi ajustado para uma concentração final de $25X10^6$ espermatozoides vivos/µL.

A cada gota de fecundação, já contendo os oócitos foram adicionados 8µL da suspensão do sêmen. O período de incubação (Thermo Mod. 3110) foi de 20 horas em atmosfera de 5% de CO_2 com umidade relativa de 95% e temperatura de 38,5ºC.

3.7 Cultivo e desenvolvimento embrionário *in vitro* (CIV)

Previamente a passagem para as placas de cultivos, os presumíveis zigotos passaram por sucessivas pipetagens, ainda na placa de FIV, com o objetivo de remover as células do *cumulus*. Os presumíveis zigotos foram lavados em duas gotas do meio TL-Sêmen, onde foram completamente desnudados e duas gotas do meio de cultivo a qual iam ser postos sendo eles SOFaaci sequencial ou SOFaaci tradicional. As composições dos meios estão descritas na Tabela 1.

Cada placa foi preparada com microgotas de 100 µL do meio de cultivo, sendo eles SOFaaci tradicional ou SOFaaci sequencial fase A e recobertas com óleo mineral, foram postos grupos de 20 a 25 zigotos por gota.

Devidamente identificadas com os grupos experimentais, as placas foram postas em cultivo sob diferentes concentrações atmosféricas de oxigênio, sendo 5% de O_2, 5% de CO_2 e N_2 balanço (White Martins, Praxair INC, Osasco, SP, BR), 12% de O_2, 6% de CO_2 e N_2 balanço (White Martins, Praxair INC, Osasco, SP, BR) e 20% de O_2, 5% de CO_2 em ar atmosférico em uma incubadora Thermo Mod. 1131, à 38,5ºC por 168 horas.

As atmosferas de 5 e 12% de O_2 eram preparadas em embalagens plásticas (*bag system*, polipropileno de baixa densidade - ZPP Embalagens, Santa Rita do Passa Quatro, SP, BR) medindo 25x35 cm, 0,06mm de espessura e impermeáveis a gases conforme descrito por Arias; Sanchez; Felmer (2011), em que a placa de CIV era sobreposta a um frasco de cultivo celular, revestidas pelos sacos plásticos que eram selados na ponta e, com um cateter 14G, era realizado uma pequena abertura para remoção do ar contido no interior da embalagem, através de uma bomba a vácuo e, seguinte a isso, era injetado a mistura gasosa para cultivo celular (Figura 9).

A partir disso foram formados seis grupos experimentais, sendo eles os grupos cultivados em meio tradicional (ST), com diferentes atmosferas: ST20 (SOFaaci Tradicional em 20% O2), ST12 (SOFaaci Tradicional em 12% O2) e ST5 (SOFaaci Tradicional em 5% O2) e os cultivados em meio sequencial (SS) com diferentes atmosferas: SS20 (SOFaaci Sequencial em 20% O2), SS12 (SOFaaci Sequencial em 12% O2) e SS20 (SOFaaci Sequencial em 5% O2).

Tabela 1. Relação dos componentes e concentrações utilizadas nos meios de cultivo embrionário, SOFaaci tradicional e SOFaaci sequencial.

Componentes	**SOFaaci Tradicional**	**SOFaaci Sequencial**	
	(mM)	**SOF. A (mM)**	**SOF. B (mM)**
NaCl	107,7	107,7	107,7
KCl	7,15	7,15	7,15
CaCl2-2H20	1,78	1,78	1,78
KH2PO4	1,20	1,20	1,20
MgSO4-7H2O	1,50	1,50	1,50
DL- ácido Lático Na (60%)	4,23	10,50	5,87
NaHCO3	25,00	25,00	25,00
Piruvato	0,32	0,32	0,10
Frutose	0,50	0,50	3,15
Alanil- Glutamina (NE)	0,20	0,50	1,00
Inositol	2,78	0,278	2,78
Citrato Na-2H2O	0,34	0,34	0,113
BSA (6 mg)	6g/L	6g/L	6g/L
SFB (2,5%)	25 mL/L	25 mL/L	25mL/L
Aminoácidos MEM (100X)	10mL/L	5mL/L	5mL/L
Aminoácidos BME (50X)	10mL/L	10mL/L	45mL/L

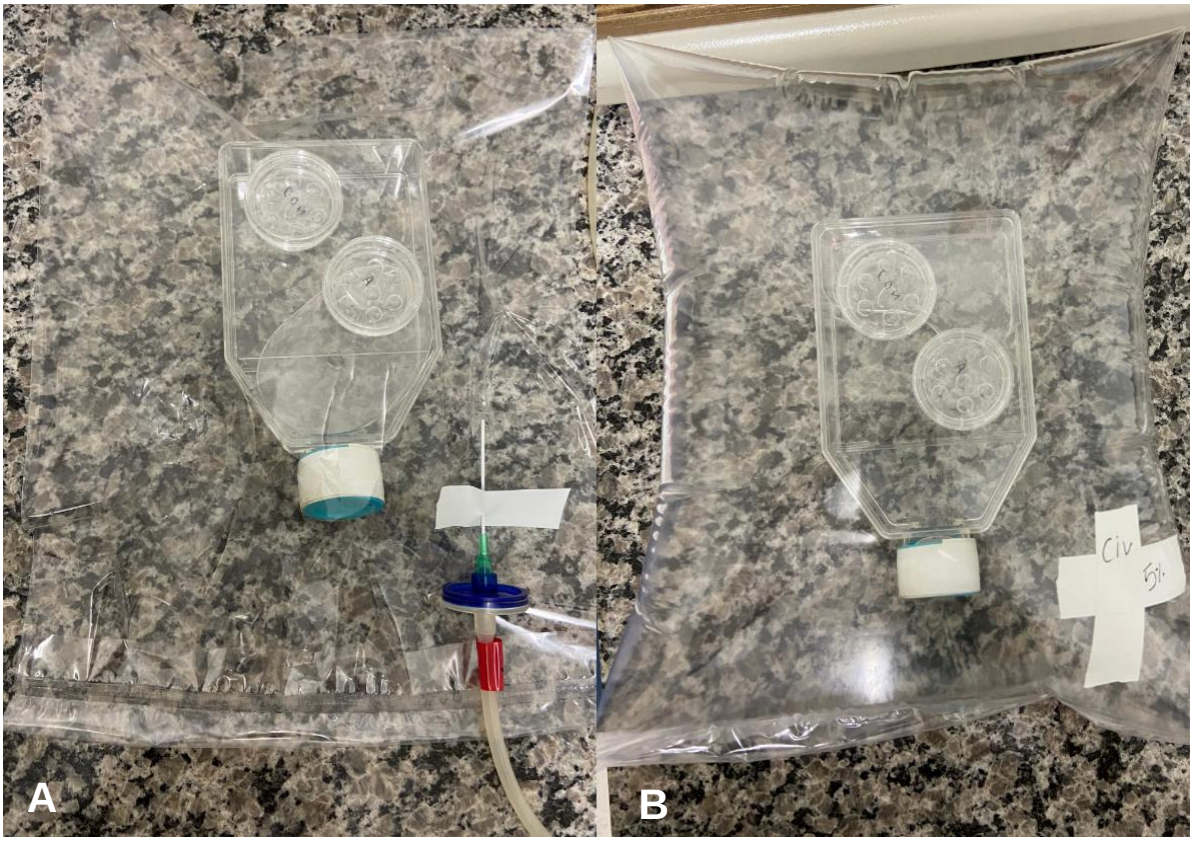

Figura 9. Técnica Bag System para cultivo embrionário. A: retirada do ar do interior da embalagem através de uma bomba a vácuo, B: Bag system com mistura gasosa já injetada para cultivo embrionário.

3.8 Renovação dos meios de cultivo embrionário

No segundo dia de cultivo, 48 horas pós fertilização (hpf) foi realizada a contagem de clivagem das estruturas a qual serviu para saber a porcentagem de produção embrionária no sétimo dia. No quarto dia (96 hpf) de cultivo foi efetuada a troca dos meios para renovação dos constituintes metabólicos e energéticos. Os grupos do que estavam sendo cultivados em SOFaaci Sequencial Fase A, era removido 75 µL do meio e acrescido com 75 µL do Sofaaci Sequencial fase B, o mesmo era repetido no quinto dia (120 hpf) de cultivo, com o objetivo de realizar a renovação de aproximadamente 94% do meio. Foi realizado o mesmo procedimento

descrito com os grupos do SOFaaci Tradicional, todavia, a renovação era realizada com o mesmo meio.

No sétimo dia de cultivo (168hpf) foi realizada a contagem de estruturas embrionárias produzidas, as estruturas contabilizadas eram blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto eclodido, sendo que as duas primeiras classificações foram destinadas a vitrificação, coloração para contagem celular e avaliação da mensuração de EROs.

3.9 Vitrificação e aquecimento embrionário

O procedimento de vitrificação e reaquecimento foram realizados conforme descrito por Vajta; Holm; Greve (1996), modificado. As 168hpf, os embriões em estágio de blastocisto e blastocisto expandido foram retirados do meio de CIV e foram lavados em meio de manutenção pré-aquecido a 37ºC constituído por TCM 199, acrescido com 5 mM de Bicarbonato de Sódio, 10mM de Hepes Sódico e 10 mM de Hepes Ácido, 100 mM de Piruvato Sódico, 5µg/mL de Sulfato de Amicacina (ABL – Antibióticos do Brasil, Cosmópolis, SP, Brasil), suplementado com 20% de SFB (CRIPION, Andradina, SP, BR).

Na sequência, os embriões passaram pelo meio de equilíbrio pré-aquecido a 37ºC, constituído pelo meio de manutenção e suplementado com 16% de Etilenoglicol (EG) e 16% de Dimetilsulfóxido (DMSO), onde permaneceram por três minutos, tendo por decorrente a passagem para o meio de vitrificação pré-aquecido a 37ºC, constituído pelo meio de manutenção implementado com 16,5% de EG, 16,5% de DMSO e 0,5 mM de Sacarose, em que foram mantidos por 30 segundos. Assim sendo, os embriões foram pipetados juntamente com o meio e envazados em hastes de vitrificação (Vitringá, IngaMed, Maringá, PR, Brasil), subsequente, os embriões foram armazenados em botijões de nitrogênio líquido.

Para o reaquecimento dos embriões criopreservados, as hastes de vitrificação foram retiradas dos botijões de armazenamento e postas em uma caixa de isopor contendo nitrogênio líquido. Foi retirada uma haste por vez do nitrogênio líquido e

imersa a sua ponta onde continha os embriões no primeiro meio de desvitrificação pré-aquecido a 37ºC constituído pelo meio de manutenção suplementado com 20% de SFB (CRIPION, Andradina, SP, BR) e 0,3 mM de Sacarose onde os mesmos permaneceram durante três minutos, tendo o intuito de iniciar a remoção dos crioprotetores. Após o tempo transcorrido, as estruturas eram passadas para a segundo meio de desvitrificação (meio de manutenção, suplementado com 20% de SFB (CRIPION, Andradina, SP, BR) e 0,15 mM de Sacarose), onde também permaneceram por três minutos e por último foram transferidas para o terceiro meio de desvitrificação (meio de manutenção, suplementado com 20% de SFB (CRIPION, Andradina, SP, BR), permanecendo pelo mesmo tempo dos ambos os meios.

3.10 Avaliação da criotolerância embrionária

Após a passagem das estruturas aos meios de desvitrificação, essas estruturas foram cultivadas por 48 horas em suas subsequentes condições finais dos grupos experimentais, sendo eles, SOFaaci Sequencial Fase B nas concentrações atmosféricas de 5% de O_2, 5% de CO_2 e 90% N_2 ou, 12% de O2, 6% de CO_2 e N_2 balanço e em ar (20% de O_2), 5% de CO_2 e N_2 balanço à 38,5ºC. Os grupos do meio SOFaaci Tradicional também seguiram as mesmas concentrações atmosféricas de cultivo citadas acima.

Decorrente as 48 horas, foi realizada a contagem da reexpansão e eclosão dos embriões, sendo considerados criotolerantes ao processo de vitrificação apenas as estruturas eclodidas.

3.11 Mensuração de Espécies reativas de oxigênio (EROs) em embriões

Os embriões em estágios de blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido, que teriam sua avaliação a fresco, eram retirados de suas condições de cultivo e lavados duas vezes em meio PBS/PVP 1%.

Em seguida, foi realizado protocolo descrito por Assis et al. (2015) modificado, as estruturas eram postas em uma placa quatro poços, onde a primeira gota continha o reagente CellRoX™ Green (Invitrogem®, Massachusetts, EUA), diluído em solução PBS na concentração final de 5 µM, onde eram incubados na mesma condição de cultivo que se encontravam, a 37ºC por 30 minutos. Na sequência asestruturas eram lavadas nos outros três poços contendo PBS/PVP 1% e armazenadas em microtubos contendo 1mL de PBS/PVP 1% para posterior avaliação.

Os embriões que iriam ser avaliados, eram reaquecidos conforme descrito no item 3.8 e recultivados por 48h conforme descrito no item 3.9. Após 48 horas, as estruturas reexpandidas e eclodidas eram coradas com CellRox Green™ (Invitrogem®, Massachusetts, EUA), com o mesmo protocolo anteriormente descrito.

As imagens foram obtidas e avaliadas conforme descrito por Assis et al. (2015), os embriões eram removidos dos microtubos e postos em placas de Petri contendo uma gota de PBS/PVA 1%, adiante, eram posicionadas ao microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus, IX5), excitação 485nm e emissão de 520 nm. As fotos foram obtidas através do software Q-Capture® (Readley, Virginia, AU), e mensurado os níveis de epifluorescência no programa ImageJ® (NIH, Maryland, EUA).

Sendo que, quanto mais intenso o verde emitido pela epifluorescência, maior era as concentrações de espécies reativas de oxigênio nos embriões (Figura 10).

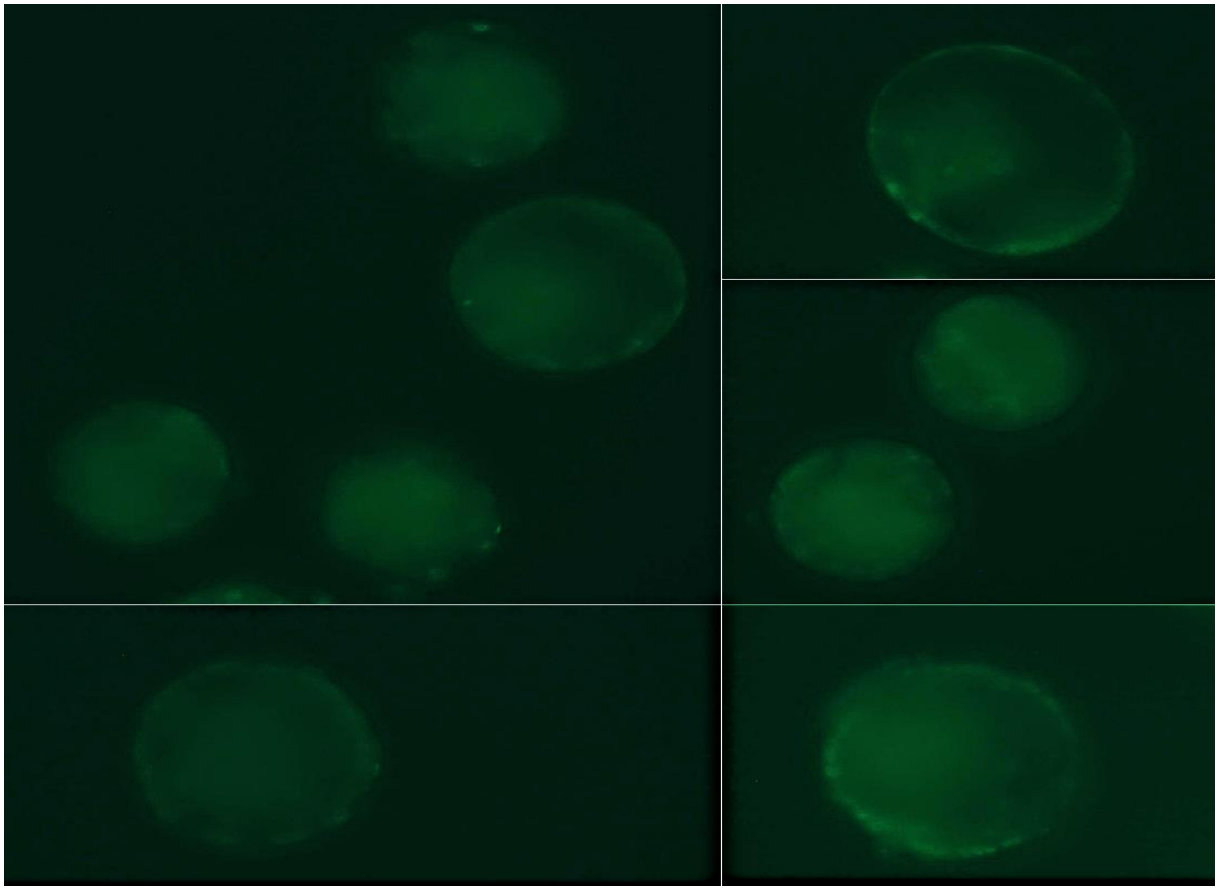

Figura 10. Embriões corados pela sonda CellRox™ Green e avaliados em epifluorescência para detecção de espécies reativas de oxigênio.

3.12 Contagem do número total de células embrionárias

Os embriões utilizados para esse procedimento foram fixados em paraformoldeido 4%. Os mesmos foram removidos das placas de cultivo de seus respectivos grupos experimentais, passados para uma placa quatro poços contendo no primeiro poço 500 µL de PBS/PVP 1%, com o objetivo de remover o meio de cultivo embrionário, em seguida eram transferidos para o segundo poço havendo 500 µL paraformoldeido 4%, onde permaneceram por uma hora. Consecutivo a isso, eram lavadas nos últimos dois poços com 500 µL de PBS/ PVP 1% e armazenados em microtubos contendo 1,5 mL de PBS/PVP 1%.

As estruturas foram coradas conforme protocolo descrito por Almodin et al. (1999), modificado.

Foi utilizada uma placa quatro poços para a realização da coloração. Essa placa foi preparada com cinco minutos de antecedência do início da coloração e mantida a 37ºC. As estruturas fixadas foram removidas do microtubo onde estavam armazenadas e transferidas para o primeiro poço da placa contendo PBS/PVP 1%. Em seguida, os embriões foram movidos para o segundo poço da placa onde continha o corante Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, San Louis, MO, EUA) na concentração de 1µg/mL, sendo que, para diluição do mesmo foi acrescido 500µL de PBS/PVP 1%. Os embriões permaneceram no corante por quinze minutos, protegidos da luz e aquecidos a 37ºC. Posterior a isso, os embriões foram transferidos para os últimos dois poços da placa que continham PBS/PVB 1% com o intuito de remover o excesso de corante das estruturas celulares para serem montados em lâminas.

As lâminas foram preparadas com uma gota de 2 µL de glicerol no centro da mesma, adicionado 10 embriões e recobertos por uma lamínula. As lâminas foram visualizadas em microscópio invertido com epifluorescência (Olympus IX-70) com filtro apropriado (Olympus - cubo U-MWU) com emissão 330nm e excitação 395nm. As imagens foram captadas em aumento de 40x pelo software AxioVision® 2.0 (Oberkochen, Baden-Württemberg, DE). As células foram contadas no software ImageJ® (NIH, Maryland, EUA) (Figura 11).

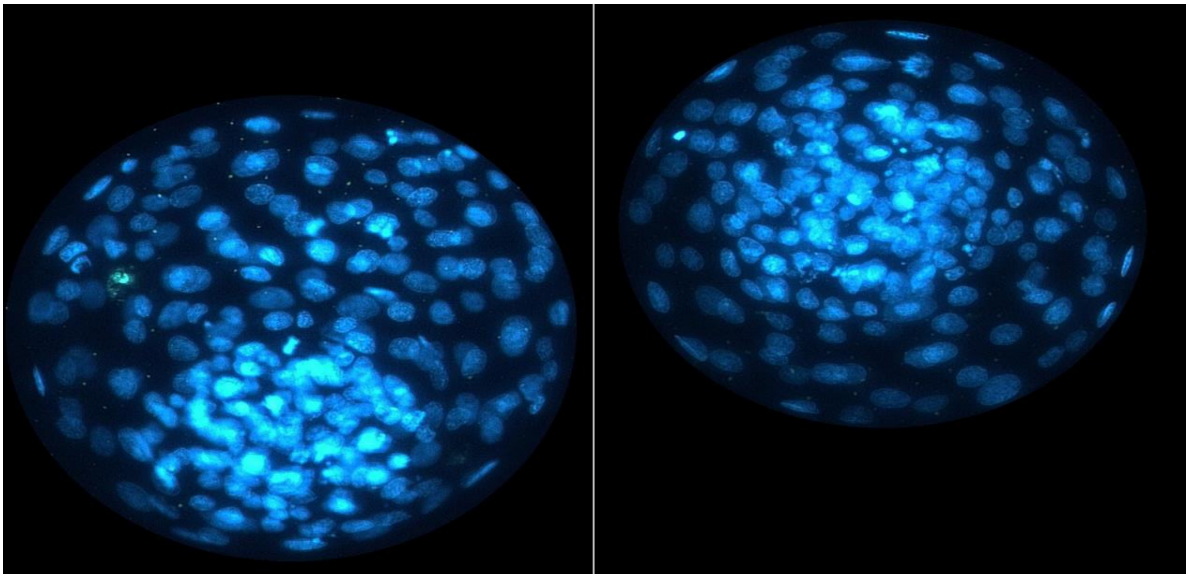

Figura 11. Embriões ao sétimo dia de cultivo corados com Hoescht 33342, para contagem do número de células embrionárias totais.

3.13 Análise estatística

Os dados são apresentados em números e porcentagem. Primeiramente, os dados foram avaliados para ver se havia uma normal distribuição e homogeneidade das variâncias. A porcentagem de produção embrionária, total de células e estresse oxidativo foram comparados usando o ANOVA com posterior realização do teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados foram processados no programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary. NC, USA). As taxas de sobrevivência e degeneração embrionária de embriões vitrificados foram analisadas usando o Teste X2 (Qui-quadrado) para comparar a homogeneidade das variáveis, sendo o considerado o valor de P igual ou inferior a 0,05 ($p<0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Produção e qualidade embrionária

Foi utilizado um total de 11640 complexos cumulus oócitos em 25 rotinas de PIVE para a realização do experimento. Todos os resultados aqui expostos estão apresentados na Tabela 2.

A análise de produção dos embriões *in vitro*, foi contabilizada sob número de estruturas clivadas obtidas a partir das 25 repetições. O grupo que apresentou maior produção de embriões foi o ST5 (meio tradicional com atmosfera de 5% de O_2) com 53,9%, sendo maior (*P*=0,028) que os grupos SS12 (meio sequencial com atmosfera de 12%) com 40,2% e SS20 (meio sequencial com atmosfera de 20% O_2) com 41,6% e próximo aos grupos ST20 (meio tradicional com atmosfera de 20% O_2), ST12 (meio tradicional com atmosfera de 12% O_2) com 45,3% e 49,7% respectivamente e SS5 (meio sequencial com atmosfera de 5% O_2) com uma produção de 45%.

Durante a produção dos embriões, percebeu-se que as estruturas cultivadas em meio SOFaaci Sequencial, apresentavam um desenvolvimento de blastocistos mais atrasados no D7, quando confrontado com embriões cultivados em meio SOFaaci Tradicional.

A avaliação da contagem celular total, apresentou o ST5 (meio tradicional com atmosfera de 5% de O_2) como o tratamento com maior número de células (131), não diferindo apenas do grupo ST12 (meio tradicional com atmosfera de 12% O_2,) com 128 células. Não houve diferença significativa do grupo ST12 com os grupos ST20 (meio tradicional com atmosfera de 20% de O_2, 114 células), SS12 (meio sequencial com atmosfera de 12% de O_2, 110 células) e SS5 (meio sequencial com atmosfera de 5% de O_2, 112 células). O grupo que apresentou o menor número de células por embriões foi o SS20 (98), não diferindo dos grupos ST20, SS12 e SS5. Pode-se notar que embriões derivados de cultivo em atmosferas reduzidas de O_2, apresentaram um desenvolvimento mais acelerado, bem como um maior número de células.

Quando mensurada a fluorescência relativa da área para obtenção do estresse oxidativo embrionário, os tratamentos que apresentaram maior intensidade de fluorescência foram SS12 (8,27) e ST5 (7.46) que não diferem entre si, entretanto, diferiram dos demais tratamentos (p<0,01). Os embriões cultivados em ST20 (4.10) e SS20 (4.23) apresentaram os menores valores de estresse oxidativo e não diferiram entre si, no entanto, diferiram dos tratamentos ST12 (5,30) e SS5 (5,93), que apresentaram concentrações intermediárias de espécies reativas de oxigênio.

Tabela 2. Produção, células e estresse oxidativo em embriões bovinos produzidos em meio SOFaaci, normal e sequencial nas atmosferas de 20, 12 e 5% de O_2.

Tratamento	Total de oócitos	Clivagem n (%)	Embriões n (%)	Total de células	Estresse oxidativo
ST20	2278	1721 (75,5)	779 (45,3) ^{ab}	114 ^{BC}	4,10 ^{z}
ST12	1624	1264 (77,8)	628 (49,7) ^{ab}	128 ^{AB}	5,30 ^{y}
ST5	1828	1482 (81,1)	799 (53,9) ^{a}	131 ^{A}	7,46 ^{x}
SS20	2307	1787 (77,5)	718 (40,2) ^{b}	98 ^{C}	4,23 ^{z}
SS12	1746	1272 (72,8)	529 (41,6) ^{b}	110 ^{BC}	8,27 ^{x}
SS5	1857	1520 (81,8)	684 (45,0) ^{ab}	112 ^{BC}	5,93 ^{y}
Total	11640	9046 (77,7)	4137 (45,7)	-	-

Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa (P<0,05). Para análise das amostras foi utilizado Analise da variância e posterior teste de Tukey.

Pôde-se observar que não houve interação entre os fatores meio e atmosfera gasosa no cultivo embrionário (p>0.05), mostrando assim que, ambos os fatores não interagem entre si e cada um responde individualmente durante o processo de cultivo *in vitro* (Figura 12), em relação a produção e número de células embrionárias totais (Figura 13). Entretanto, quando avaliamos a comparação dos meios SOFaaci tradicional x SOFaaci sequencial, para a produção de embriões, observamos que o meio SOFaaci tradicional teve uma maior taxa (p<0,05) de estruturas produzidas (49,4% vs. 42,2%). A comparação de produção embrionária entre as atmosferas (A20% x A12% x A5%), mostrou que a maior produção (p<0,001) de embriões se deu na atmosfera de 5% de O_2 (42,7%, 45,6% e 49,4% respectivamente).

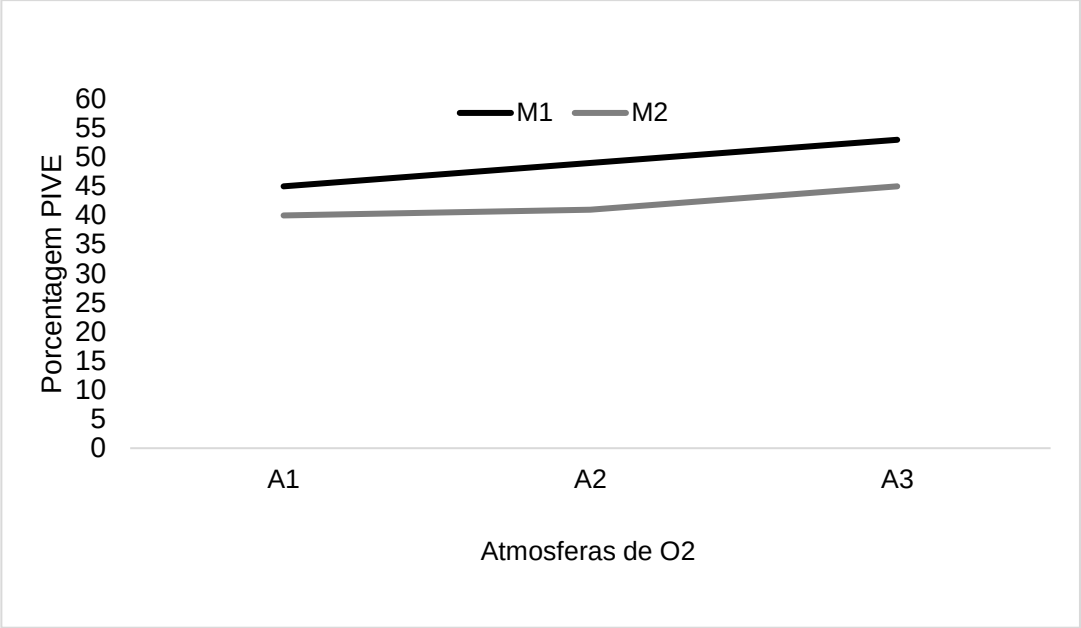

Figura 12. Diagrama de produção embrionária no meio de cultivo SOFaaci tradicional (preto) e SOFaaci sequencial (cinza) x atmosfera de O_2 A1(20%), A2 (12%) e A3 (5%) para produção de embriões *in vitro*.

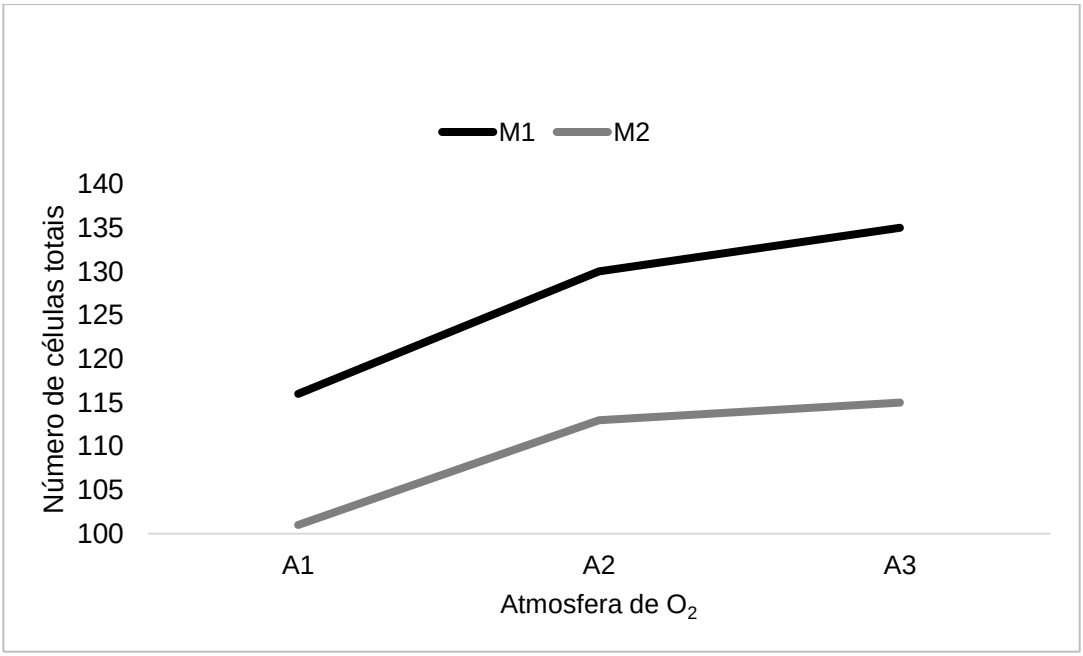

Figura 13. Diagrama de número de células do meio de cultivo SOFaaci tradicional (preto) e SOFaaci sequencial (cinza) x atmosfera de O_2 A1(20%), A2 (12%) e A3 (5%) para número de células embrionárias totais.

4.2 Reaquecimento e qualidade embrionária

Foram reaquecidos um total de 1346 embriões vitrificados, sendo que desses, 546 degeneraram e 800 sobreviveram a criopreservação, após 48h de recultivo, a sobrevivência após a vitrificação foi dependente dos tratamentos (p<0,01). Os dados estão apresentados na Tabela 3.

Quando verificada a taxa de embriões que sobreviveram ao processo de vitrificação, o grupo que apresentou melhor taxa de sobrevivência, com recuperação de 80,1% foi o T6, que diferiu de todos os demais tratamentos de cultivo embrionário. O grupo T4 apresentou menor sobrevivência à criopreservação (42,3%) diferindo dos tratamentos T1, T2, T3 e T5.

Tabela 3. Taxa de sobrevivência e degeneração embriões bovinos vitrificados, após 48h de reaquecimento.

Tratamento	Reaquecidos	Degenerados n (%)	Recuperados n (%)
ST20	289	115 (39,7)	174 (60,2) [b]
ST12	183	61 (33,3)	122 (66,6) [b]
ST5	178	70 (39,3)	108 (60,6) [b]
SS20	218	126 (57,7)	92 (42,3) [c]
SS12	292	137 (46,9)	155 (53,08) [b]
SS5	186	37(19,8)	149 (80,1) [a]
Total	1346	546 (40,5)	800 (59,4)

Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa (P<0,05). Para análise das amostras foi utilizado teste X^2.

Dentre os 800 embriões sobreviventes, avaliamos as taxas de reexpansão e eclosão entre os grupos experimentais (Tabela 4), o tratamento que teve maior taxa de eclosão (p<0,01) foi o ST12 (81,2 %) tendo, evidentemente, a menor taxa de reexpansão (18,8%), diferindo, significativamente, dos demais tratamento em ambas as análises. Os tratamentos ST5 (51,8%), SS20 (38,1%) e SS5 (33,5%) apresentaram as piores taxas de eclosão, com isso, obviamente apresentando as maiores taxas de reexpansão. Foi observado que embriões cultivados em SOFaaci sequencial durante

o processo de recultivo, exibiram uma eclosão reduzida, em que, muitas vezes, ocorria o rompimento da zona pelúcida, porém, não havia a completa eclosão da estrutura celular apresentado na Figura 14.

Durante as análises de mensuração da fluorescência relativa da área de embriões sobreviventes a vitrificação, no grupo dos reexpandidos, pôde-se observar uma maior intensidade no tratamento ST20 (2.65), diferindo significativamente (*p*=0,042) apenas dos grupos SS12 (1.99) e ST12 (1.94). A avaliação do estresse oxidativo dos embriões eclodidos não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (*p*=2,78).

Tabela 4. Embriões bovinos recuperados após vitrificação, avaliados quanto a expansão, eclosão e estresse oxidativo após 48h reaquecimento.

Tratamento	Recuperados	Reexpandidos		Eclodidos	
	n (%)	n (%)	Est. Oxid.	n (%)	Est. Oxid.
ST20	174	51 (29.3)	2,65 [a]	123 (70,7) [y]	2,80
ST12	122	23 (18,8)	1,94 [ab]	99 (81,2) [x]	2,05
ST5	108	52 (48,1)	2,24 [ab]	56 (51,8) [z]	3,31
SS20	92	57 (61,9)	2,25 [ab]	35 (38,1) [z]	2,64
SS12	155	45 (27,7)	1,99 [b]	110 (70,9) [y]	2,32
SS5	149	99 (66,4)	2,22 [b]	50 (33,5) [z]	2,28
Total	800	327 (40,8)	-	473(59,12)	-

Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa (P<0,05). Para análise das amostras foi utilizado teste X^2.

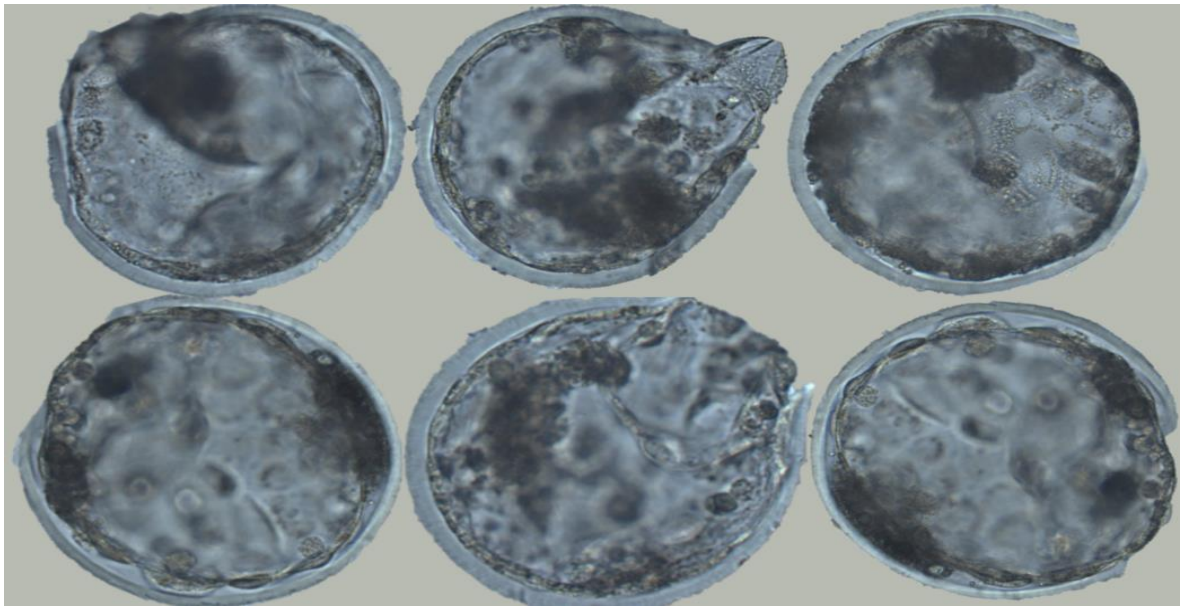

Figura 14. Embriões reaquecidos e recultivados em SOFaaci sequencial onde apresentam o rompimento da zona pelúcida, porém sem êxito para eclosão total, analisados através de microscopia óptica com aumento de 40x, fotografados com o software Q-Capture.

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de meios de cultivo embrionário, continua sendo muito estudado e de grande importância para aumentar as taxas de produção embrionária *in vitro*, a dinâmica do metabolismo embrionário pode comprometer o desenvolvimento dos mesmos e reduzindo a sua viabilidade. No nosso estudo, desenvolvemos um meio SOFaaci sequencial visando oferecer as devidas necessidades embrionárias em cada fase do seu estágio, bem como, saber o efeito do mesmo no processo de vitrificação.

Os embriões dos tratamentos SS20 e SS12 com meio SOFaaci sequencial, apresentaram um desenvolvimento e taxa de produção significativamente inferior quando comparado com o meio tradicional (ST5), estando, esse resultado, de acordo com Gardner e Lane (1998), em que descrevem que, as taxas de desenvolvimento embrionário superiores não ocorrem em cultivo com meios sequenciais quando confrontado com o meio de etapa única, os meios sequenciais ajudam na adaptação e progresso para estágio de blastocisto. Entretanto, quanto mais semelhante ao fisiológico são as circunstancias de cultivo *in vitro*, maior é o estresse metabólico exposto a esses embriões, podendo resultar em perdas da competência no seu desenvolvimento (Gardner, 1998).

Trabalhos realizados com animais da raça Nelore (Sanches et al, 2013), comparando a produção de embriões dos meios sequenciais G1/G2 com meio único SOFaa, não observaram diferença significativa entre os grupos experimentais na taxa de produção embrionária, bem como, na taxa de gestação. Os nossos resultados diferem dos achados encontrados da pesquisa citada anteriormente, em que pode-se perceber uma maior produção em meios SOFaaci tradicional, sugerindo que embriões preferem meios de etapa única (“*let the embryo choose”*), do que meios com composição previamente estabelecida conforme estágio de desenvolvimento.

As ofertas nutricionais para o embrião mudam constantemente durante o trajeto *in vivo* no trato reprodutivo materno (Restall e Wales, 1966), quando cultivado *in vitro* o embrião desenvolve uma plasticidade significativa para poder responder as

mudanças energéticas e se adaptar a diversas condições disponibilizadas, diferentes da *in vivo* (Lane et al, 2003; Felmer et al, 2011), essas adequações fazem o embrião adaptar sua programação celular bem como as vias de sinalização, gerando uma capacidade de desenvolvimento, até mesmo em situações de estresse, no entanto, essas adaptações podem causar interrupção do desenvolvimento ou redução da qualidade embrionária (Ramos-Ibeas et al., 2019). Ao ajustarmos as ofertas energéticas nos meios sequencias, propondo uma condição mais próxima a fisiológica, foi possível observar uma redução no número de células embrionárias totais nos grupos T4 e T5, estando, isso, diretamente relacionado a uma diminuição da qualidade embrionária dos mesmos (Arat et al, 2002; Wang et al, 2011; Felmer et al, 2011), sendo que o número de células embrionárias totais está associado a um maior taxa gestacional em bovinos (Mori, Otoi e Suzuki, 2002), suínos (Swain, Bormann e Krisher, 2001) e humanos (Check et al, 2001).

Durante a produção dos embriões, percebeu-se que estruturas cultivadas em meio SOFaaci sequencial, apresentavam um desenvolvimento de blastocistos mais atrasados no D7 (168hpf), quando confrontado com embriões cultivados em meio SOFaaci tradicional. Isso pode estar relacionado ao maior número de células totais pelo meio tradicional e ocasionando um desenvolvimento retardado, refletindo em um menor número de células embrionárias nos meios sequenciais (Mesut et al 2014).

Alguns grupos de pesquisa trazem o meio sequencial como uma opção para a produção embrionária tanto em escala comercial (Lane et al, 2003), como em pesquisas (Xu et al, 2004; Garcia et al, 2007; Koyner et al, 2010; Felmer et al, 2011 Choi et al, 2016,), propondo que o desenvolvimento embrionário em condições mais próximas ao fisiológico facilita o sucesso da técnica de PIVE. As taxas de produção do presente trabalho mostraram que a produção de embriões em meio SOFaaci sequencial foi eficiente e que os embriões conseguem se adaptar ao meio sequencial para desenvolvimento, entretanto os embriões desenvolvidos nesses grupos apresentam um resultados de criotolerância (eclosão) menor que os embriões de grupos SOFaaci tradicional devido a perda na capacidade de eclosão das estruturas, podendo estar relacionado a baixa qualidade, ocasionando perda na competência para total eclosão celular.

Pode-se notar que embriões derivados de cultivo em atmosferas reduzidas de O_2, apresentaram um desenvolvimento mais acelerado, bem como um maior número de células. É sabido que o O_2 é um importante regulador metabólico embrionário, que intervém na edição gênica, proteoma e metabolismo energético. A concentração da atmosfera de cultivo faz com que embriões alterem seus consumos de aminoácidos e carboidratos, em que as concentrações atmosféricas de O_2 estão associadas a uma reduzida captação de glicose e maior atividade glicolítica e um maior consumo de aminoácidos, ocasionando, uma menor viabilidade embrionária devido maior produção de amônia. Todavia, embriões cultivados em condições reduzidas de O_2, tem uma maior utilização de glicose e melhor utilização de aminoácidos, aumentando sua qualidade e viabilidade (Wale e Gardner, 2012), tal como maiores taxas de blastocisto (Yun-Yi et al, 2017).

Quando contabilizado o número de células embrionárias totais, grupos de cultivo em atmosfera de 20% apresentaram uma redução na quantidade de células devido as altas concentrações de O_2 (Thampson et al, 1990; Van Soom et al, 2002; Yuan et al, 2003; Karagenc, 2004; Wale e Gardner, 2010), onde essa condição pode aumentar o número de células apoptóticas (Yuan et al, 2003), bem como induzir a senescência celular, ocasionando uma menor taxa de divisão celular, consequentemente, resultando em um menor número de células por embriões (Meuter et al, 2014). Por sua vez, quando reduzimos a tensão de O_2 de 20% para 5%, houve uma melhora na capacidade do desenvolvimento e na qualidade, em que esses embriões apresentavam um desenvolvimento mais acelerado, tendo um maior número de blastocistos ao D7 e maior número de células, podendo, assim, estar relacionados redução dos índices apoptóticos (Saini et al, 2015) o que seria capaz de, também, aumentar suas taxas de implantações (Bagheri et al, 2018).

Outro aspecto relacionado as atmosferas de cultivo embrionário, é o estresse oxidativo gerado pelo oxigênio. As EROs são moléculas fisiológicas do organismo, atuando em diversas sinalizações celulares e mediando as respostas ao estresse, porém quando em excesso muitas vias de sinalização são acionadas ocasionando danos que acarretam em disfunções celulares comprometendo progresso do embrião *in vitro* (Harvey, Kind e Thampson, 2002; Murphy, 2009; Zhang et al, 2016). Essas disfunções celulares estão relacionando diretamente com a função mitocondrial, em

que o estresse oxidativo ocasiona alteração na permeabilidade da membrana da mitocôndria, acarretando na perca de íons, metabólitos e redução na produção de ATP (Takahashi et al, 2000; Guérin, Mouatassim e Ménézo, 2001).

O resultado encontrado no presente trabalho, mostra que embriões frescos, cultivados em atmosfera controlada apresentam maiores concentrações de EROs (ST12, ST5, SS12 e SS5), indo na contramão de resultados publicados por demais autores, onde concluem que uma concentração mais baixa de O_2 ocasiona uma redução nas EROs, enquanto 20% possui concentrações mais altas, podendo ser prejudicial aos embriões (Harvey et al, 2002; Bain, Madan e Betts 2010; Bomfim et al, 2017; Yun-Yi et al, 2017).

Propomos que há um aumento da produção de EROs em condições de baixo O_2 (Thomas e AshcroftA, 2019) que desencadeia uma adaptação a partir de um estresse subletal nos embriões (Kütz, 2005; Vandele et al, 2010; Rahman et al, 2012; Jiang et al, 2016), conferindo competência a esses embriões o que resulta em um aumento na produção *in vitro* (Pribenszky et al 2012). Na célula, a reação de competência, engloba detectar, avaliar e neutralizar danos induzidos pelo estresse, consequentemente aumentando a tolerância a danos posteriores (Kütz, 2005; Pribenszky et al, 2010), todavia, se a implicação do estresse estiver a cima dos limiares de tolerância desenvolvido, ocorrerá apoptose celular (Hansen 2007; Bain, Madan e Betts, 2011). A resistência a fatores estressantes, pode estar ligada a ativação da catalase, enzima responsável por catalisar as deteriorações causadas por ROS e, das atividades da enzima GPx (glutationa peroxidase), que atua reduzindo os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (Chen et al, 2005; Loren et al, 2020).

Quando as concentrações de O_2 são reduzidas, como nos grupos acima citados, existe um desequilíbrio entre a chegada de elétrons a partir da oxidação de nutrientes na matriz mitocondrial e a transferência de elétrons para o O_2 molecular, originando uma maior formação de EROs. Além dessa linha de defesa através da GPx, as células apresentam outro mecanismo de resistência contra as EROs, o fator induzível por hipóxia 1 (HIF-1) (Thomas e AshcroftA, 2019), este que por sua vez, através da baixa concentração de O_2, aumenta a quantidade de transportadores de glicose e enzimas glicolíticas fazendo com que haja uma maior produção de ATP pela

glicólise, reduzindo significativamente a ação da enzima piruvato-desidrogenase (PDH) que fornece acetil-CoA ao ciclo do ácido cítrico. Essas mudanças se opõem a formação de EROs, devido a diminuição do suprimento de $FADH_2$ e NADH (Hernándes-García et al., 2010; Nelson; Cox, 2019)

Ao averiguarmos os resultados da criotolerância embrionária (Tabela 3), constatamos que o grupo T6, que era cultivado em meio sequencial e atmosfera de 5% de O_2, teve o melhor resultado quanto a sobrevivência dos embriões (80,2%), tendo a maior taxa de reexpansão, entretanto, a menor taxa de eclosão dos sobreviventes (Tabela 4). Conforme descrito anteriormente, foi observado que esses embriões durante o processo de recultivo, exibiram uma eclosão reduzida, onde muitas vezes, ocorria o rompimento da zona pelúcida, porém, não havia a completa eclosão da estrutura celular. Justificamos isso devido o cultivo em SOFaaci sequencial ser considerado uma condição subótima aos embriões (Máté e Török, 2020), resultando em um estresse metabólico (Gardner, 1998), ocasionando perda na eficiência da eclosão total.

Meios de etapa única, demonstraram desenvolver embriões mais resistentes ao processo de criopreservação, isso é demonstrado quando comparamos os grupos ST20 e SS20, ST12 e SS12, ST5 e SS5, em que esses são comparados devido cultivo em mesma atmosfera, mudando apenas o meio de CIV, os grupos ST20, ST12 e ST5 apresentam uma maior eclosão em relação ao SS20, SS12 e SS5 (Tabela 4).

Quando avaliamos o efeito meio sob as atmosferas, pôde-se constatar que a atmosfera exerce mais influência em meios SOFaaci sequencial do que em meio SOFaaci tradicional, em que há uma maior variação de embriões recuperados em embriões de meio sequencial, quando confrontado com o tradicional (Tabela 3), compreendendo que, embriões cultivados em concentrações de O_2 mais altas (~20%), tem uma redução na sua taxa de eclosão quando comparado a embriões cultivados em condições de atmosfera de O_2 controlada (Yuan et al, 2003; Jin-Rho et al., 2007).

6 CONCLUSÃO

Portanto, os embriões cultivados em meio SOFaaci tradicional e em atmosfera de 5% de O_2 apresenta melhor taxa de produção embrionária e maior número de células embrionárias totais por embrião.

Ao reduzirmos a tensão de 20% para 5% de O_2 no cultivo embrionário, houve elevação nas concentrações de EROs.

Quando avaliado a sobrevivência embrionária ao processo de vitrificação o cultivo em SOFaaci tradicional não foi influenciado pelas atmosferas utilizadas. Entretanto o SOFaaci sequencial apresentou maior taxa de recuperação nas atmosferas de 5% e 12% de O_2.

A eclosão embrionária após o cultivo de recuperação foi maior na atmosfera de 12% de O_2 nos dois meios utilizados.

Depois de tudo isso, os resultados desse estudo mostram que meio de cultivo tradicional favorece ao melhor desenvolvimento e qualidade embrionária. Quando associado a atmosfera de 12% de O_2 aumenta as taxas de sobrevivência à criopreservação. No entanto, a redução da concentração de O_2 favorece a maior produção de EROs, a qual induz estresse oxidativo subletal, proporcionando melhor resposta dos embriões ao processo de vitrificação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H (2002) Accumulation of cytoplasmatic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in diferente culture systems using sérum-free or sérum-containing media. **Molecular Reproduction and Development** 61: 57-66.

Abe H, Hoshi H (2003) Evalution of bovine embryo produced in high performance sérum-free media. **Journal of Reproduction and Development** 49: 193-202.

Agarwal A, Gupta S, Sharma RK (2005) Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology** 3: 28.

Alcron VB, Marikawa Y (2018). In.: Trophectoderm developmnet. In:. Skinner MK (2ºed) **Encyclopedia of Reproduction.** Elsevier Inc, p. 326 – 331.

Almodin CG, Moron AF, Kulau-Junior L, Krüguer E, Pereira LAC, Minguetti-Câmara VC (1999) Evalution of the post-biopsy development of bovine embryos: Proposal of a training model. **Reprodução humana e Genética** 21:533-538.

Arat S, Gibbson J, Rzucidlo J, Respess DS, Tumlin M,Stice SL (2002) In vitro development of bovine nuclear transfers embryo transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype. **Biology of Reproduction** 66:1768-1774.

Arias ME, Sanchez R, Felmer R (2011) Evalution of diferente culture systems with low oxygen tension on the developmnet, quality and oxidative stress-related genes of bovine embryos produced in vitro. **Zygote** 20:209-217.

Arigony ALV, Oliveira IM, Machado M, Bordin DL, Bergter L, Prá D, Henriques JAP (2013) The influence of micronutrientes in cell culture: a reflexiono n viability and genomic stability. **Biomedicine Research international** 2013: 597282.

Assis PM, Castro LS, Siqueira AFP, Delgado JC, Hamilton TRS, Goissis MD, Camilla Mota Mendes, Nichi M, Visintin JÁ, Assumpção MEOD (2015) System for evalution of oxidative stress on in-vitro-produced bovine embryos. **Reproductive Biomedicine Online** 31: 577-580.

Bagheri D, Kazemi P, Sarmadi F, Shamsara M, Hashemi E, Joupari MD, Dashtizad M (2018) Low oxygen tension promotes invasive ability and ambryo implantation rate. **Reproductive Biology** 18: 295-300.

Bain NT, Madan P, Betts DH (2011) The early embryo response to intracelular reactive oxygen species is developentally regulated. **Reproduction, fertility and Development** 23: 561-575.

Barbehenn EK, Wales RG, Lowry OH (1974) The explanation for the blockade of glycolysis in ealy mouse embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 71: 1056-1060.

Bavister BD (1999) Interactions between embryos and the culture milieu. **Theriogenology** 53: 619-626.

Bavister BD (1995) Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction Update** 1:91-148.

Biggers JD (2001) Thoughts on embryo culture conditions. **Reproductive Biomedicine Online** 4: 30-38.

Bomfim MM, Andrade GM, Del Collado M, Sangalli JR, Fontes PK, Nogueira MFG, Meirelles FV, Da Silveira JC, Perecin F (2017) Antioxidant responses and deregulation of epigenetic writers and erasers link oxidative stress and DNA methylation in bovine blastocysts. **Molecular Reproduction & Development** 84:1296-1305.

Carolan C, Lonergan P, Van Langendonckt A, Mermillod P (1994) Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. **Theriogenology** 43: 1115-1128.

Chang, MC (1959) Fertilization of rabbit ova in vitro. **Nature** 184: 466-467.

Check JH, Wilson C, Summers-Chase D, Choe JK, Nazari A, Lurie D (2001) Pregnancy rates (prs) according to embryo cell number at time of embryo transfer (ET). **Clinical Expert Obstetrics and Gynecologi** 28: 73-77.

Chen ZH, Yoshida Y, Saito Y, Niki E (2005) Adaptation to hydrogen peroxide enhances PC12 cell tolerance Against oxidative damage. **Neuroscience Letters** 383: 256-259.

Choi WJ, Lee JH, Lee SH, Yum SY, Lee SJ, Lim CW, Jang G (2016) Developmental competence and cryotolerance of caprine parthenogenetic embryos cultured in chemically defined media. **Theriogenology** 86: 596-603.

Dannery PA (2007) Effects of oxidative stress on embryonic development. **Birth Defects Research** 81: 155-162.

Davis TC, White RR (2020) Breeding animals to feed people: the many roles of animal reproduction in ensuring global food security. **Theriogenology** 150: 27-33.

De Loss F, Kastrop P, Van Mauryk., Vanbeneden TH, Kruip,TA (1991) Heterologous cell contacts and metabolics coupling in bovine cumulus oocyte complexes. **Molecular Reproductive Development** 28: 255-259.

Devlin TM (7ª ed) (2010) **Textbook of Biochemistry with clinical correlations**. EUA: Danvers – MA, 1207 p.

Dunning KR, Russel DL, Robker R (2014) Lipids and oocyte developmental competence: the role of datty acids and β-oxidation. **Reproduction** 148: 15-27.

Duque P, Hidalgo CO, Gómez E, Pintado B, Facal N, Diéz C (2003) Macromolecular source as dependent on osmotic pressure and water source: effects on bovine in vitro embryo development and quality. **Reproductive Nutrition Development** 43: 487-496.

Felmer RN, Arias ME, Muñoz GA, Rio JH (2011) Effect of different sequential and two-step culture systems on the development, quality, and RNA expression. Profile of bovine blastocyst produced in vitro. **Molecular Reproduction e Development** 78: 403-414.

Ferguson EM Leese HJ (1999) Triglyceride contente of bovine oocyte and early embryos. **Journal of Reproduction and Fertility** 116: 373-378.

Fernie AR, Carri F, Sweetlove LJ (2004) Respiratory metabolismo: glycolysus, the TCA cycle and mitochondrial eléctron transport. **Current Opinion in Plant Biology** 7: 254-261.

Fissore RA, Kurokawa M, Knott J, Zhang M, Smyth J (2002) Mechanism underlying oocyte activation and postovulatory ageing. **Reproduction** 134: 745-754.

Francis GL (2010) Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications. **Cytotechnology** 62: 1-16.

Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K, Toyoda Y (1990) Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. **Biology of Reproduction** 42: 114-119.

Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G (2003) Bovine embryo Technologies. **Theriogenology** 59: 599-616.

Garcia SM, Marinho LSR, Lunardelli PA, Seneda MM, Meirelles FV (2015) Developmental block and programmed cell seath in *Bos indicus* embryos: effects of protein supplementation souce and developmental kinetics.**Plos One** 10: e0119463.

Garcia-Garcia RM, Ward F, Fair S, O'Meara CM, Wade M, Duffy P, Lonergan P (2007) Development and quality of sheep embryos cultured in comercial G1.3/G2.3 sequential media. **Animal Reproduction Science** 98: 233-240.

Gardner DK (1998) Change in requeriments and utilization of nutrientes during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. **Theriogenology** 49: 83-102.

Gardner DK (2011) Embryo metabolismo and in vitro culture**.** In.: Poncelet C, Sifer C (1ªed.) **Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain.** Paris: Springer, p. 511- 519.

Gardner DK (2015) Lactate production by the mammalian blastocyst: manipulating the microenvironment for uterine implantation and invasion?. **Bioessays Journal** 37: 364-371.

Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J. Enviroment of the preimplantation human embryo *in vivo*: metabolite analysis of the oviduct and uterine fluids and metabolismo of cumulus cells. **Fertility and Sterility** 65:349-353.

Gardner DK, Lane M (1998) Culture of viable human blastocyst in defined sequential sérum-free media. **Human Reproductive** 13: 148-159.

Gardner DK, Leese HJ (1990) Concentration of nutrientes in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolismo in vitro**. Journal Reproduction and Fertility** 88: 361-368.

Gardner DK, Harvey AJ (2015) Blastocyst metabolism. **Reproduction, Fertility and Development** 27: 638-654.

Gaspar RC, Arnold DR, Corrêa CAP, Rocha Jr CV, Penteado JCT, Del Collado M, Vantini R, Garcia JM, Lopes FL (2015) Oxygen tension affects histone remodeling of in vitro produced embryos in bovine model. **Theriogenology** 83: 1408-1415.

Gilchrist RB, Thompson JG (2007) Oocyte maturation: emerging concepts and Technologies to improve developmental potential in vitro**. Theriogenology** 67: 6-15.

Givens MD, Marley SD (2008) Approches to biosecurity in bovine mebryo transfer programs. **Theriogenology** 69: 129-136.

Gonçalves PBD, De Oliveira MAL, Mezzalira A, Montagner MM, Visintin JÁ, Da Costa LFS (2008) Produção in vitro de embriões. In.: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF (2ªed) **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: ROCA, cap. 14, p.261-291.

Gómez E, Rodríguez A, Muñoz M, Caamaño JN, Hidalgo CO, Morán E, Facal N, Díez C (2008) Serum free embryo culture médium improves in vitro survival of blastocyst to vitrification. **Theriogenology** 69: 1013-1021.

Gopichandran N, Leese HJ (2003) Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid. **Reproduction** 126: 299-308.

GORDON I (2ª Ed) (2003) Laboratory Production of Cattle Embryos. Cambridge: CAB International University Press, 548p.

Gottardi FP, Mingoti GZ (2009) Bovine oocyte maturation and influence on subsequent embryonic developmental competence. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 33: 82-94.

Greenhouse WVV, Lehninger AL (1977) Magnetitude of malate-aspartate reduced nicotinamide adenina dinucleotide shutte activity in intact respiring tumor cells. **Cancer Research** 37: 4173-4181.

Gstraunthaler G (2003) Alternatives to the use of fetal bovine sérum: sérum-free ceel culture. **Altex** 20: 275-281.

Guedes S, Vitorino R, Domingues R, Amado F, Domingues P (2009) Oxidation of bovine serum albumin: identification of oxidation products and structural modifications. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** 23:2307-2315.

Guérin B, Guienne BL, Thibier M (2000) A secure health status associated with the production and trade of in vitro derived cattle embryos. **Livestock Production Science** 62: 271-285.

Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y (2001) Oxidative stress and protection Against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update** 7: 175-189.

Hall AG (1999) The role of glutatione in the regulation of apoptosis. **European Journal of Clinical Investigation** 29:238-245.

Hansen PJ (2007) To be or not to be – Determinants of embryonic survival following heat shock. **Theriogenology** 68s: s40-s48.

Harvey AJ (2007) The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Animal Reproduction Science** 98: 113-128.

Harvey AJ, Kind KL, Thompson JG (2002) Redox regulation of early embryo development. **Reproduction** 123:479-486.

Harvey AJ, Kind KL, Pantaleon M, Armstrong DT, Thompson JG (2004) Oxygen-regulated gene expression. In bovine blastocysts. **Biology of Reproduction** 71: 1108-1119.

Harvey MB, Arcellana-Panililio MY, Zhang X, Schultz GA, WArson AJ (1995) Expression of gnes encoding antioxidante enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo coculture. **Biology of Reproduction** 53: 532-540.

Holm P, Booth PJ, Schimidt MH, Greve Tm Callesen H (1999) High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or whitout serum-proteins. **Theriogenology** 52: 683-700.

Hosoe M, Shioya Y (1997) Distribuition of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote** 5: 371-376.

Houghton FD, Humperson PG, Hawkhead JÁ (2003) Na^+,K^+, ATPase activity in the human and bovine preimplantation embryo. **Developmental Biology** 263:360-366.

Houghton FD, Leese HJ (2004) Metabolism and developmental competence of the preimplantation embryo. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology** 115S: S92-S96.

Hyttel P, Xu KP, Smith S, Greve T (1986) Ultrastructure of *in-vitro* oocyte maturation in cattle. **Journal Reproduction and Fertility** 78: 615-625.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2017) **Censro Agro 2017**. Disponível em:<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/3096/agro_2017_resultados_definitivos.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2021.

Jiang HS, Wang WL, Lu KH, Gordon I, Polge C (1992) Examination of cell numbers of blastocysts derived from IMV, IVF and IVC bovine folicular oocytes. **Theriogenology** 37: 229.

Karagenc L (2004) Impacto f oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes. **Reproductive Biomedicine Online** 9: 409-417.

Kelley RL, Gardner DK (2019) Individual culture and atmospheric oxygen during culture affect mouse preimplantation embryo metabolismo and post-implantation development. **Reproduction Biomedicine Online** 39: 3-18.

Khurana NK, Niemann H (2000) Energy metabolismo in preimplantation bovine embryos derived in vitro or *in vivo*. **Biology of Reproduction** 62: 847-856.

Kim JH, Niwa K, Lim JM, Okuda K (1993) Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of in vitro-maturation, in vitro-fertilized bovine oocyte in a chemically defined, protein-free culture médium. **Biology of Reproduction** 48: 1320-1352.

Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T (2004) Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology** 62: 1186-1197.

Kline D (2000) Attributes and dynamics of the endoplasmic reticulum in mammalian eggs. **Current Topics in Developmental Biology** 50:125-154.

Korhonem K, Kananen K, Ketoja E, Matomäki J, Halmekytö M, Peippo J (2010) Effects of sérum-free in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryos development and cell allocation in two developmental stages of day 7 blastocyst. **Reproduction in Domestic Animals** 45: 42-49.

Koyner P, Pino J, Berbey R (2010) Embryo development and pregnancy rates of in vitro produced bovine embryos cultured in high and low-oxygen (O_2) atmosphere tension with sequential media (SM). **Fertility and Sterility** 94: s150.

Krisher RL, Lane M, Bavister BD (1999) Development competence and metabolismo of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. **Biology of reproduction** 60: 1345-1352.

Kültz D (2005) DNA damage signals facilitate osmotic stress adaptation. **Journal Renal Physiologi** 289: F504-F505.

Lamy J, Gatien J, Dubuisson F, Nadal-Desbarats L, Salvetti P, Mermillod P, Saint-Dizier M (2018) Metabolic profiling of bovine oviductal fluid across the oestruss cycle using próton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Reproduction, Ferility and Development** 30:1021-1028.

Lane M, Gardner DK (1999) Selection of viable mouse blastocysts prior to tranfer using a metabolic criterion. **Human Reproduction** 11: 1975-1978.

Lane M, Gardner DK (2000) LActate regulate pyruvate upkate and metabolismo in the preimplantation mouse embryo. **Biology of Reproduction** 62: 16-22.

Lane M, Gardner DK, Hasler MJ, Hasler JF (2003) Use of G1.2/G2.2 media for comercial bovine embryo culture: equivalente development and pregnancy rates compared to co-culture. **Theriogenology** 60: 407-419

Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruip T, Niemann H, Galli C (2002) Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. **Biology of Reproduction** 67: 767-775.

Lee, KF, Chow JCF, Xu JS, Chan STH, Ip SM, Yeung WSB (2001) A comparative study of gene expression in murine embryos developed in vivo, cultured in vitro, and cocultured with human oviductal cells using messenger ribonucleic acid differential display. **Biology of Reproduction** 64: 910-917.

Leese HJ, Biggers JD, Mroz EA, Lechene C (1984) Nucleotides in a single mammalian ovum or preimplantation embryo. **Analytical Biochemistry** 140: 443-448.

Leibo SP, Loskutoff NM (1993) Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. **Theriogenology** 39: 81-94.

Leivas FG, Brum DS, Fialho SS, Saliba WP, Alvim MTT, Bernardi ML, Rubin MIB, Silva CAM (2011) Fetal calf sérum enhances in vitro production of *Bos taurus indicus* embryos. **Theriogenology** 75: 429-433.

Lu KH, Gordon I, Gallagher M (1987) Pregnancy established in cattle by transfer of embryo derived from in vitro fertilization of oocyte matured in vitro. **Veterinary Record** 121: 259-260.

Luberda Z (2005) The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology** 5: 5-17.

Machtinger R, Racowsky C (2012) Culture systems: single step. In: Smith GD, Swain JE, Pool TB (1ªed) **Embryo Culture.** EUA, p. 199- 209.

Mahé C, Gatien J, Desnoes O, Bourhis DL, Mermillod P, Salvetti P, Saint-Dizier M (2021) Metabolomic analysis of oviduct fluid in day 3 post-estrus in Holstein heifers. **Reproductive Biology** 21: 100512.

Marzzoco A Torres BB (3a Ed) (2007) **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: ED. GUANABARA KOOGAN, 357p.

Mastroianni Jr L, Jones R (1965) Oxygen tension withn the rabbit fallopian tube. **Journal of Reproduction and Fertility** 9: 99-102.

Mayes MA, Sirard MA (2000) The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology** 55: 911-922.

McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JSM, Speake BK (2000) Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocyte with intact zona pelúcida. **Journal of Reproduction and Fertility** 118: 163-170.

Meister A, Anderson ME (1983) Glutathione. **Annual Review of Biochemistry** 52: 711-760.

Meuter A, Rogmann LM, Winterhoff BJ, Tchkonia T, Kirkland JL, Morbeck DE (2014) Markers of cellular senescence are elevated in murine blastocysts cultured in viro: molecular consequences of culture in atmospheric oxygen. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics** 31: 1259-1267.

Miller JGO, Schultz GA (1987) Amino acids contente of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract. **Biology of Reproduction** 36: 125-129.

Mishra M, Reddy IJ, Gupta PSP, Mondal S (2016) L-carnitine mediated reduction in oxidative stress and alteration in transcript level of antioxidante enzyme in sheep embryos produced in vitro. **Reproduction in Domestic Animals** 53: 311-321.

Moreno RD, Schatten G, Ramalho-Santos J (2002) Golgi apparatus dynamics during mouse oocyte in vitro maturation: effect of the membrane trafficking inhibitor brefelding A[1]. **Biology of Reproduction** 66: 1259-1266.

Mori M, Otoi T, Suzuki T (2002) Correlation between the cell number and diameter in bovine embryos produced in vitro. **Reproduction in Domestic Animals** 37: 181-184.

Murillo A, Muñoz M, Martín-González D, Carrocera S, Martínez-Nistal A, Gómez E (2017) Low serum concentration in bovine embryo culture enhances early blastocyst rate on Day-6 with quality traits in the expanded blastocyst stage similar to BSA-cultured embryos. **Reproductive Biology** 17: 162-171.

Murillo-Ríos A, Maillo V, Muñoz M, Guitiérrez-Ádan A, Carrocera S, Martín-González D, Fernandez-Buznego A, Gómez E (2017) Short- and long-term outcome of the absence of protein during bovine blastocyst formation in vitro. **Reproduction, Fertility and Developmental** 29: 1064-1073.

Murphy MP (2009) How mitocôndria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal** 417: 1-13.

Nelson DL, Cox MM (7ª ed) (2019) **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: ARTMED, 1278p.

Niemann H, Wrenzycki C (2000) Alterations of expression. Of developmentally importante genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology** 53: 21-34.

O'Fallon JV, Wright Jr RW (1996) Pyruvate revisited: A non-metabolic role for pyruvate in preimplantation embryo development. **Theriogenology** 43: 288.

Orsi NM, Leese HJ (2004) Amino acid metabolismo of preimplantation bovine embryos cultured with bovine sérum albumin or polyvinyl alcohol. **Theriogenology** 61:561-572.

Payne C, Schatten G (2003) Golgi dynamics during meiosis are distinct from mitosis and are coupled to endoplasmic reticulum dynamics until fertilization. **Developmental Biology** 264: 50-63.

Pemble LB, Kaye PL (1976) Whole protein uptake and metabolismo by mouse blastocysts. **Journal Reproduction and Fertility** 78: 149-157.

Pereira RM et al (2008) Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. **Animal Reproduction Science** 106: 322-332.

Peters Jr, T (1ºed) (1995) All about Albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. San Diego: ACADEMIC PRESS, 415p.

Pieterse MC, Kappen RA (1988) Aspiration of bovine oocyte during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology** 4:751-763.

Pribenszky C, Vajta G, Molnar M, Du Y, Lin L, Bolund L, Yovich J (2010) Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. **Biology of Reproduction** 83: 690-697.

Pribenszky C, Lin L, Du Y, Losonczi E, Dinnyes A, Vajta G (2012) Controlled stress improves oocyte performance – cell preconditioning in assisted reproduction. **Reproduction in Domestic Animals** 47:197-206.

Rahman MB, Vandaele L, Rijsselaere T, Zhadi M, MAes D, Shamsuddin M, Van Soom A (2012) Oocyte quality determines bovine embryo development after fertilisation with hydrogen peroxide-stresses spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development** 24: 608-618.

Ramesh-Kumar G, Mishra A, Reddy IJ, Dhali A, Roy SC (2020) Low oxygen tension activates glucose metabolismo, improves antioxidante capacity and augment developmental potential of ovine embryos in vitro. **Animal Production Science** 60: 503-509.

Ramos-Ibeas P, Heras S, Gómez-Redondo I, Planells B, Fernández-González E, Pericuesta E, Laguna-Barraza R, Pérez-Cerezales S, Gutiérrez-Adán A (2019) Embryo responses to stress induced by assisted reproductive technologies. **Molecular Reproduction & Development** 86: 1292-1306.

Reinaudo PF, Giritharan G, Talbi S, Dobson AT, Schultz RM (2006) Effects of oxygen tensiono n gene expression. In preimplantation mouse embryo. **Fertility and Sterlity** 86: 1252-1265.

Restall BJ, Wales RG (1966) The fallopian tube of the sheep. **Australian Journal of Biological** 19: 687-698.

Rizos D, Fair T, Papadopoulos S, Boland MP, Lonergan P (2002) Developmental, qualitative, and ultrastructural diferences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Molecular Reproduction and Development** 62: 320-327.

Saini M, Selokar NL, Agrawal H, Singla SK, Chauhan MS, Manik RS, Palta P (2015) Low oxygen tension improves developmental competence and reduces apoptosis in hand-made cloned buffalo. **Livestock Science** 172: 106-109.

Seo YJ, Lee JW, Lee HE, Lee HK Kim HW, Kim YH (2004) Role of glutathione in the adaptative tolerance to H_2O_2. **Free Radical Biology & Medicine** 37: 1272-1281.

Sanches BV, Pontes JHF, Basso AC, Ferreira CR, Perecin F, Seneda MM (2017) Comparison of synthetic ovisuctal fluid and G1/G2 medium under low-1 oxygen atmosphere on embryo production and pregnancy rates in Nelore (*Bos indicus*) cattle. **Reproduction in Domestic Animals** 48: 7-9.

Senna-Netto SV, Spricigo JFW, Leme LO, Guimarães LS, Caixeta FMC, Dode MAN, Pivato I (2020) The replacement of fetal bovine serum with bovine serum albumin during oocyte maturation and embryo culture does not improve blastocyst quality after slow freezing cryopreservation. **Biopreservation and Biobanking** 18:171-179.

Snijders SEM Dillan PG, O'Farrell KJ, Diskin M, Wylie ARG, O'Callaghan DO, Rath M, Boland MP (2001) Genetic merit for milk production and reproductive success in dairy cows. **Animals Reproduction Science** 65: 17-31.

Souza DK, Salles LP, Rosa e Silva AAM (2015) Aspects of energetic substrate metabolismo of in vitro and in vivo bovine embryos. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 48: 191-197.

Stanke DF, Sikes JD, DeYoung DW, Tumbleson ME (1974) Proteins and amino acids in bovine oviducal fluid. **Journal Reproduction and Fertility** 38: 493-496.

Stricker AS (2006) Structural reorganizations of the endoplasmic reticulum during egg maturation and fertilization. **Cell & Developmental Biology** 17: 303-313.

Sudano MJ, Paschoal DM, Rascado TS, Crocomo LF, Magalhães LCO, Martins Jr A, (2012) Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. **Zygote** 22:124-131.

Swain JE, Bormann CL, Krisher RL (2001) Development and viability of in vitro derived porcine blastocysts cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential médium. **Theriogenology** 56: 459-459.

Takahashi M, Keicho K, Takahashi H, Ogawa O, Schulte RM, Okano A (2000) Effect of oxidative stress on development and DNA damage in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. **Theriogenology** 54: 137-145.

Takahashi Y, First NL (1992) In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. **Theriogenology** 37: 963-978.

Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA (1972) Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. **Journal Reproduction and Fertility** 30: 493-497.

Tester M, Langridge P (2010) Breeding Technologies to increase crop production in a chaning world. **Science** 327: 818-822.

Thampson JGE, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE, Tervit HR (1990) Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. **Journal Reproduction and Fertility** 89: 573-578.

Thibault C, Szöllösi D, Gérard M (1987) Mammalian oocyte maturation. **Reproductive Nutrition Development** 27: 865-896.

Thomas LW, Ashcroft M (2019) Explaning the molecular interface between hypoxia-inducible fator signalling and mitochondria. **Cellular and Molecular Life Science** 76: 1759-1777.

Thompson JG, Sherman ANM, Allen NW, Mcgowan LT, Tervit HR (1998) Total protein content and protein synthesis within pre-elongation stage bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development** 50: 139-145.

Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, Donnelly PE, Tervit HR (1990) Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. **Journal Reproduction and Fertility** 89: 573-578.

Thompson JG (2000) In vitro culture and embryo metabolismo of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. **Animal Reproduction Science** 60: 263-275.

Tomek W, Torner H, Kanitz W (2002) Comparative analysus of protein synthesis, transciption and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocyte in vitro. **Reproduction in Domestic Animals** 37: 86-91.

Tricoire H, Touzé JL, Mermillod P (1999) Effect of fetal calf serum on the quality of in vitro produced cattle embryos. **Theriogenology** 257.

Trigal B, Muñoz M, Gómez E, Caamaño JN, Martin D, Carrocera S, Casais R, Diez C (2012) Cell counts and survival to vitrification of bovine in vitro produced blastocysts subjected to subletal high hydrostatic pressure. **Reproduction in Domestic Animals** 48:200-206.

United Nations Organizations (2019) Department of Economic and Social Affairs - Growing at a slower pace, world population is expected to reach 9.7 billion in 2050 and could peak at nearly 11 billion around 2100. Disponível em: < https://www.un.org/development/desa/en/news/population/world-population-prospects-2019.html>. Acesso em: 17 nov. 2021.

Vajta G (2006) Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive Biomedicine Online** 12: 779-796.

VAJTA G, HOLM P, GREVE T (1996) Overall efficiency of in vitro embryo production and vitrification in cattle. **Theriogenology** 45: 683-689.

Van Der Valk J et al (2018) Fetal bovine serum (FBS): past-present-future. **Altex** 35: 99-119.

Van Langendockt A, Auquier P, Donnay I, Massip A, Dessy F (1996) Acceleration of in vitro bovine embryo development in the presence of fetal calf serum. **Theriogenology** 45: 194.

Van Soom A, Boerjan ML, Bols PEJ, Vanroose G, Lein A, Coryn M, Kruif A (1997) Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation. **Biology of Reproduction** 57: 1041-1049.

Van Soom, Yuan YQ, Peelman LJ, De Matos DG, Dewulf J, Laevens H, Kruif A (2002) Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tension with or without cysteine addition. **Theriogenology** 57: 1453-1465.

Van Wagtendonk-De Leeuw AM, Mullaart E, De Roos APW, Merton JS, Den Daas JHG, Kemp B, De Ruigh L (2000) Effects different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology** 53: 575-597.

Vandaele L, Thys M, Bijttebier J, Van Langendonckt A, Donnay I, Maes D, Meyer E, Van Soom A (2010) Short-term exposure to hydrogen peroxide during oocyte maturation improves bovine embryo development. **Reproduction** 139:505-511.

Varago FC, Mendonça LF, Lagares MA (2008) Bovine embryo production: state of art and perspective of a constant Evolution technique. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 32: 100-109.

Viana J (2020) 2019 statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter** 38: 1-15.

Van Huong D, Catt S, Amaya G, Batsiokis M, Walton S, Taylor-Robinson AW (2018) Comparison of pregnancy in cattle When non-vitrified and vitrified in vitro-derived embryos are transferred into recipientes. **Theriogenology** 120: 105-110.

Voet D, Voet JG (4ªed) (2010) **Biochemistry**. Nova Jersey: WILEY, 1428 p.

Wale PL, Gardner DK (2010) Time-lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradientes. **Reproductive Biomedicine Online** 21:402-410.

Wale PL, Gardner DK (2012) Oxygen regulates amino acid turnover and carbohydrate uptake during the preimplantation period of mouse embryo development. **Biology of Reproduction** 87: 1-8.

Walker SK, Hill JL, Kleemann DO, Nancarrow CD (1996) Development of ovine embryo in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. **Biology of Reproduction** 55:703-708.

Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO (2011) A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. **Animal Reproduction Science** 123: 127-138.

Wang S, Liu Y, Holyoak GR, Bunch TD (1997) The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre-and postcleavage-stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M199 media. **Animal Reproduction Science** 48: 37-45.

Wang YS, Tang S, Na ZX, Li WZ, Liu J, Quan FS, Hua S, Zhang Y (2011) Effect of mSOF and G1.1/G2.2 media on the developmental competence of SCNT- derived bovine embryos. **Reproduction in Domestic Animals** 46: 404-409.

Watanabe YF, Accorsi MF, Watanabe MR, Dayan A, Meirelles FV (2008) Aspecto comercial de embriões produzidos in vitro. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF (2ªed) **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: ROCA, cap. 15, p.293-301.

Whittingham DG (1968) Fertilization of mouse eggs in vitro. **Nature** 220: 592-593.

Xu, JS, Chan ATH, Lee WWM, Lee KF, Yeung WSB (2004) Differential growth, cell proliferation, and apoptosis of mouse embryo in various culture media and in coculture. **Molecular Reproduction and Development** 68: 72-80.

Yuan YQ, Van Soom A, Coopman FOJ, Mintiens K, Boerjan ML, Van Zeveren A, De Kruif A, Peelman LJ (2003) Influence of oxygen tensiono n apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. **Theriogenology** 59:1585-1596.

Yun-Yi M, Huei-Wen C, Chii-Ruey T (2017) Low oxygen tension increases mitochondrial membrane potential and enhances expression of antioxidant genes and implantation protein of mouse blastocyst cultured in vitro. **Journal of Ovarian Research** 10:47.

Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, Dong W (2016) ROS and ROS-mediated cellular signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** 2016: 4350965.

Zheng X, Baker H, Hancock WS, Fawaz F, McCaman M, Pungor Jr E (2006) Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for

cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. **Biotechnology Progress** 22: 1294-1300.