

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Uso de meio SOF (*Synthetic Oviductal Fluid*)
durante o final da maturação oocitária *in vitro*
sobre produção embrionária em bovinos**

MAICKON WILLIAN DE FREITAS

BOTUCATU-SP
2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**Uso de meio SOF (*Synthetic Oviductal Fluid*)
durante o final da maturação oocitária *in vitro*
sobre produção embrionária em bovinos**

MAICKON WILLIAN DE FREITAS

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação do Instituto de Biociências
de Botucatu, Universidade Estadual
Paulista – UNESP, para a obtenção do
título de Mestre em Farmacologia e
Biotecnologia

Orientador: Anthony César de Souza Castilho

BOTUCATU-SP
2020

F866u Freitas, Maickon Willian de
Uso de meio SOF (Synthetic Oviductal Fluid) durante o final da maturação oocitária in vitro sobre produção embrionária em bovinos / Maickon Willian de Freitas. -- Botucatu, 2020
47 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: Anthony César de Souza Castilho

1. Oviduto. 2. complexos cumulus oócitos. 3. produção in vitro de embriões. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

DEDICO ESTE TRABALHO A MINHA FAMÍLIA,
QUE SEMPRE ESTIVERAM ME APOIANDO NOS
MEUS PROJETOS PESSOAIS, POIS SEM ELES NÃO
SERIA POSSÍVEL CHEGAR ATÉ AQUI!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por permitir chegar até aqui, sem ele nada seria possível.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Anthony César de Souza Castilho, que em um momento de dificuldade me estendeu a mão e me aceitou orientar, mesmo sem nos conhecermos, atitude qual foi possível a realização deste projeto e pelo crescimento profissional que pude adquirir com a realização deste projeto. Não tenho palavras para expressar o meu agradecimento, e a admiração que tenho por ele. Serei Eternamente Grato! Muito Obrigado!

Aos amigos de laboratório Sarah, Priscila e Vitoria (Chefinha) que me auxiliaram e ajudaram na execução do projeto no laboratório LAMEM/ASSIS.

As estagiárias do LAMEM/ASSIS, Lara e Mariana, que sempre estavam dispostas a ajudar nas aspirações, trocas de meios e todas as rotinas na execução do projeto.

A Fernanda pelo auxílio em Botucatu, e por sempre me salvar quando precisava de meios.

Aos meus amigos da REPUBLICA BOI GORDO Dracena-SP, onde quando precisei de ajuda, estiveram prontos a me ajudar. E aos churrascos de fim de tarde! Valeu Galera!

A Prof^a Dr^a. Cecilia Braga Laposy, minha orientadora da graduação, que me deu a primeira oportunidade para despertar o interesse pela pesquisa.

Aos meus pais Marcos e Valeria, por sempre estarem ao meu lado nas dificuldades.

Aos meus Avós Ronaldo e Sebastiana, por sempre estarem presentes.

Ao meu irmão Rafael, pelo companheirismo nas viagens emergenciais a Botucatu.

A minha esposa Beatriz pela paciência neste período de estudos, viagens, estresse, e pelo apoio incondicional.

Amo vocês!

A seção de pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado disponibilizada.

“O cavalo prepara-se para o dia da batalha;
mas do Senhor vem a vitória.”

Provérbios 21:31

RESUMO DA DISSERTAÇÃO

A fim de mimetizar melhores condições do sistema *in vivo*, um meio de cultura mais próximo à composição do fluido do oviduto foi criado, denominado fluido ovidutal sintético (SOF), este foi formulado com base na análise bioquímica do oviduto das ovelhas. *In vivo* os momentos finais de maturação oocitária ocorrem em contato com o FO, já *in vitro* a maturação oocitária é realizada com protocolos de maturação 24h sem nenhuma alteração no meio de maturação. Portanto, o presente estudo investigou o impacto do meio de cultivo SOF durante as últimas quatro horas da maturação *in vitro* (MIV) e seus efeitos sobre a progressão meiótica e taxa de produção embrionária. Para tanto, os CCOs foram recuperados de ovário de vacas abatidas e maturados *in vitro*, nos seguintes grupos: SFB/ SFB; SFB/ SFB+SOF; BSA/BSA; BSA/BSA+SOF, todos submetidos há uma troca total de meio nas últimas quatro horas de maturação, adicionando o meio SOF de acordo com os grupos citados anteriormante. Os CCOs maturados foram fertilizados e cultivados em atmosfera e umidade controlada até o estágio de blastocisto (7 e 8 dias após a fertilização). A análise estatística foi realizada transformando os dados em arcoseno e as médias foram comparadas pelo teste T usando JMP (software JMP, SAS Institute Cary, NC). Diferenças significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$. O resultado obtido mostrou que o tratamento com SOF não tem efeito na progressão da meiose ($p = 0,5944$). Entretanto, quando analisamos as taxas embrionárias e a incorporação do SOF no meio BSA, o meio SOF é capaz de modular o rendimento embrionário que aumenta quando comparado ao tratamento com BSA ($p = 0,0194$).

Palavras-Chave: Oviduto, bovino, complexos *cumulus* oócitos, progressão meiótica, produção *in vitro* de embriões.

ABSTRACT

The oviduct and its secretion, the oviductal fluid (OF), promote an adequate environment for the final maturation of the oocyte, sperm training, fertilization, transport and initial development of the embryo. In this context, in order to mimic better conditions of *in vivo* mechanisms, a culture medium similar to the composition of the oviduct fluid, called synthetic oviductal fluid (SOF), was formulated based on biochemical analysis of the oviduct of sheep. Specifically, regarding the importance of OF for the final maturation of the oocyte in cattle, only the last four hours of oocyte maturation occur in the oviduct, which therefore permits a new strategy of oocyte maturation *in vitro* (MIV) in the bovine species. Therefore, the present study aimed to investigate the impact of SOF culture medium during the last four hours of IVM and its effects on the meiotic progression and embryonic production rate. Therefore, the COCs were recovered from ovaries of slaughtered and matured cows *in vitro*, in base medium (composed of 199 MCT with Earles salts supplemented with pyruvate, ampicillin, BSA, follicle stimulating hormone and luteinizing hormone, and another group in 199 MCT medium with Earles salts supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), pyruvate, both in moist atmosphere at 5% CO₂ for 20 hours (4 replicates with 20 COCs/group). In the last four hours of maturation, the medium was completely changed by adding the SOF medium. Matured COCs were fertilized and cultivated in a controlled atmosphere and humidity at 5% CO₂ and O₂ until the blastocyst stage (7 and 8 days after fertilization). The culture medium was partially replaced on days 3 and 5 (with addition of glucose in the latter). Statistical analysis was performed by transforming the blastocyst yield into arcsine and the means were compared by the T test using JMP (software JMP, SAS Institute Cary, NC). Significant differences were considered when $p \leq 0.05$. The result obtained showed that treatment with SOF has no effect on the progression of meiosis ($p = 0.5944$). However, when we analyze the embryonic rates and the

incorporation of SOF in BSA medium, the SOF medium is able to modulate the embryonic yield that increases when compared to treatment with BSA ($p=0.0194$).

Key-words: Oviduct, bovine, *cumulus* oocytes complexes, meiotic progression, *in vitro* embryo production.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Figure 1. Experimental design to investigate the effects of SOF in the last four hours of *in vitro* maturation. It was examined the progression meiosis (n= 202) and yields embryos (n= 20/group).

Figure 2. Effect of SOF during the last 4 hours of IVM on meiosis progression. Data are presented in mean $\pm$ SEM. The effects were testes by ANOVA. The results are obtained from 4 replicates (n=202 COC). Differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

Figure 3. Blastocyst yield (%) after the addition of SOF in the last 4h of IVM. Data are presented in mean $\pm$ SEM. The effects were testes by ANOVA. The results are obtained from 4 replicates (n=20/group). Differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

SUMÁRIO

PRÓLOGO.....	12
INTRODUÇÃO.....	15
CAPÍTULO 1.....	19
1. ESTADO DA ARTE.....	20
1.1 Aspectos gerais sobre o oviduto e seu fluido.....	20
1.2 Aspectos do fluido ovidutal e sua interação com o oócito.....	21
2. HIPÓTESE.....	25
3. OBJETIVO.....	25
4. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	25
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
CAPÍTULO 2.....	32
INTRODUCTION.....	34
MATERIAL AND METHODS.....	36
RESULTS.....	40
DISCUSSION.....	42
CONCLUSION.....	43

PRÓLOGO

Participação em eventos

2019 - VIII Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia – UNESP, Botucatu, SP.

2019 - VII Simpósio ExpoLondrina - Eficiência em Produção e Reprodução Animal (SEEPRA). Londrina, PR.

2019- X Simpósio regional de Produção e Reprodução Animal – UNIMAR, Marília, SP.

2019 – 3º Fórum Do Agronegócio – Londrina – PR.

2018 - 1º WORKSHOP FARMABIOTEC: in vitro embryo production. 2018.

2018 - 2 IMAST - International Meeting of Agrarian Science and Technology.

2018 - VII Simpósio de Farmacologia e Biotecnologia da UNESP. Botucatu, SP.

2018 - VII Simpósio Expo londrina de Eficiência em Produção e Reprodução Animal.

2018 - 14º Encontro de Engenharia Biotecnológica e Biociências de Assis.

Resumos publicados em anais de congressos

FREITAS, M. W.; FELTRIN, I. R.; COSTA, N. P.; FERREIRA, T. F. V.; MALDONADO, M. B. C.; MELO, B. P. Effects of recombinant bovine somatotropin on pregnancy per artificial insemination and corpus luteum cellular composition in beef cattle. In: 2nd International Meeting of Agrarian Science and Technology, 2018, Dracena -SP. Lista de todos os trabalhos em forma de pôster, 2018.

FERREIRA, T. F. V.; MALDONADO, M. B. C.; ESCALIEANTE JUNIOR, J. R.; MEMBRIVE, C. M. B.; FELTRIN, I. R.; HANSEN, J. H; **FREITAS, M. W.** Effects of linoleic acid supplementation in the cultivation oocytes and embryos cattle. In: 2nd International Meeting of Agrarian Science and Technology, 2018, Dracena -SP. Lista de todos os trabalhos em forma de pôster, 2018.

Apresentações de Trabalho

Freitas, Maickon Willian de; COSTA, N. P.; MALDONADO, M. B. C.; MELO, B. P.; FERREIRA, T. F. V.; FELTRIN, I. R.; MEMBRIVE, C. M. B. Effects of recombinant bovine somatotropin on pregnancy per artificial insemination and corpus luteum cellular composition in beef cattle. 2018.

Maickon Willian de Freitas “Efeito do meio SOF (synthetic oviductal fluid) durante a Maturação Oocitária sobre a Produção, Qualidade e Sobrevivência Embrionária”

Capítulo de livro

MEMBRIVE, C. M. B.; **FREITAS, M. W.;** FELTRIN, I. R.; MALDONADO, M. B. C.; FERREIRA, T. F. V.; ESCALIEANTE JUNIOR, J. R. Características anatomo-fisiológicas do sistema reprodutivo em fêmeas domésticas. In: Fábio Sampaio Rosas; Jaqueline Dalbello Biller; Samuel Ferrari; Gustavo do valle Polycarpo; Cláudia Maria Bertan Membrive; Ronaldo da Silva Viana; Rafael Simões Tomaz. (Org.). IMAST 2018 - Atualidades nas Ciências Agrárias:

mudanças, tendências e impactos. 1ed.São Paulo: Cultura Acadêmica Editora, 2018, v. 1, p. 184-220.

MEMBRIVE, C. M. B.; **FREITAS, M. W.**; FELTRIN, I. R.; ESCALIEANTE JUNIOR, J. R.; FERREIRA, T. F. V. Estratégias para Aumentar a Eficiência Reprodutivas em Fêmeas Bovinas de Corte. In: Fábio Sampaio Rosas; Jaqueline Dalbello Biller; Samuel Ferrari; Gustavo do valle Polycarpo; Cláudia Maria Bertan Membrive; Ronaldo da Silva Viana; Rafael Simões Tomaz. (Org.). IMAST 2018 - Atualidades nas Ciências Agrárias: mudanças, tendências e impactos. 1ed.São Paulo: Cultura Acadêmica Editora, 2018, v. 1, p. 221-249.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos as fêmeas bovinas têm sido alvo de numerosas pesquisas visando o melhoramento de seus gametas, principalmente aquelas consideradas geneticamente superiores (Loiola, et al 2014). A produtividade dos rebanhos bovinos tem aumentado significativamente, e isso tem sido atribuído principalmente à intensa seleção de características produtivas através do aperfeiçoamento de biotécnicas de manejo reprodutivo. Dentre as biotécnicas a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), transferência de embriões (TE) e produção *in vitro* de embriões (PIVE) estão em destaque, maximizando o potencial reprodutivo de fêmeas bovinas (Mello, et al 2016).

A PIVE, a partir de 1995, obteve uma grande expansão, principalmente no Brasil que figura hoje como um dos países mais importantes no mercado mundial de embriões. Assim, essa ferramenta promove o aumento de produtividade em larga escala em animais com genética diferenciada na cadeia produtiva (Viana, Siqueira, Palhao, & Camargo, 2012). Entretanto, existe uma dificuldade de aumentar a taxa embrionária por essa técnica, que hoje está estagnada, com taxas de produção de aproximadamente 40% nos diversos laboratórios do país. Vários trabalhos têm sido realizados visando à maior eficiência da técnica (De Matos et al., 2002; Schwarz et al., 2010; Adona et al., 2011; Dey et al., 2012, Guemra et al., 2013). Por essa razão, vários estudos têm sido realizados para obter os conhecimentos relacionados a qualidade dos oócitos (Baruselli et al 2015).

Devido ao sistema reprodutivo complexo das fêmeas muitas vezes permanecem na penumbra de muitos estudos, devido as dificuldades em determinar os diversos parâmetros. Sabe-se que o desenvolvimento do folículo ovulatório estimulado pela onda pré-ovulatória de hormônio luteinizante (LH) irá

liberar o oócito que possivelmente será fertilizado. Assim, ainda dentro do folículo, o oócito sofre mudanças significativas que desempenham um importante papel na aquisição de competência para seu desenvolvimento, dentre elas a maturação nuclear, onde o oócito tem a retomada da meiose até então em pausa no estágio de diplóteno da meiose I; e a maturação citoplasmática, que envolve a reestruturação de diversas organelas do oócito. Além disso, há uma diferenciação molecular associada às competências proteicas e transcrições (Hyttel, et al.1997; Assey et al. 1994). O oócito deve estar apto a construir e armazenar quantidades excessivas de Golgi, mitocôndrias e ribossomos e produzir receptores específicos de espermatozoides (Voronina & Wessel, 2003).

Em virtude dessa complexidade, dos quais todos os mecanismos ainda não são claros, observa-se uma clara diferença entre os oócitos obtidos da maturação *in vivo* e os oócitos maturados *in vitro*. Os oócitos *in vivo* mostram um maior potencial de desenvolvimento (Rizos, Ward, Duffy, Boland, & Lonergan, 2002). Alguns estudos revelaram discrepâncias em nível ultraestrutural, com anomalias subsequentes observadas em cromatina em blastocistos obtidos com qualquer protocolo de maturação (Blondin, Coenen, Guilbault, & Sirard, 1996).

A oogênese começa durante a vida fetal e os oócitos permanecem na prófase I até um momento antes da ovulação, quando retomam a meiose (maturação do oócito). Esse processo é iniciado com a ativação do fator promotor de maturação (MPF), levando o oócito a progredir da prófase I para a metáfase II (MII). Durante o MII, o MPF permanece em altos níveis, mantendo o oócito mantido nesse estágio até a fertilização ou ativação partenogenética (Adona et al 2006). Na maturação *in vitro* de oócitos bovinos o primeiro evento observado é a maturação nuclear, no qual ocorre o rompimento da vesícula germinativa (RVG) entre 7 e 12 horas após o início do cultivo, enquanto a metáfase I (MI) ocorre entre 12 e 15 horas. A anáfase I (AI) e a telófase I (TI) ocorrem entre 15 e 18 horas e a metáfase II (MII), a partir de 18 horas. Mais de 95% dos oócitos apresentam bloqueio em MII entre 22 e 24 horas de cultivo (Hyttel, Greve, & Callesen, 1989; Vignola et al 1994; Bertagnolli et al 2004).

Na maturação *in vivo* já foi observado papel do oviduto na formação do embrião, este é um órgão dinâmico onde ocorre a fertilização e o desenvolvimento inicial do embrião. Foi demonstrado que o ambiente oviductal pode suportar o crescimento embrionário até o estágio do blastocisto e produzir embriões de melhor qualidade em uma ampla gama de espécies (Lopera-Vasques et al 2017). A sua atuação nos processos de fertilização, maturação final do oócito, capacitação do espermatozoide e no desenvolvimento inicial do embrião, tornam esse órgão fundamental para produção embrionária (Leese, Houghton, Macmillan, & Donnay, 2001). Até mesmo as diferenças histológicas regionais do oviduto proporcionam mudanças importantes na composição do fluido do oviduto, nas quais refletem nas funções de seus segmentos como a maturação final do ovócito no infundíbulo, a capacitação dos espermatozoides no istmo e a fertilização na ampola (Ghersevich, Massa, & Zumoffen, 2015; Valleriote et al., 2015).

A composição do fluido do oviduto foi descrita em várias espécies (Hewitt, et al 1999). Dentre as espécies estão: o coelho (David, Brackett, Garcia, & Mastroianni, 1969; Gould, 1974), ovelha (Restall & Wales, 1966), vaca (Zavos et al., 1984), macaco (Mastroianni et al., 1970), humanos (Borland, Biggers, Lechene, & Taymor, 1980)(Moghissi, 1970 em camundongos (Gardner & Leese, 1990) e búfalos (Ocampo, Celestino Jr, Aquino, & Ocampo, 2016). Um total de 20 aminoácidos livres foi encontrado em fluido oviduto bovino, mas um estudo posterior mostrou que 25 aminoácidos livres estavam presentes em líquido oviduto de vacas, ovelhas, porcos, coelhos e ratos (Guérin et al., 1995, Aguilar & Reyley, 2005).

Um meio de cultura semelhante a composição do fluido ovidutal foi estabelecido, denominado fluido ovidutal sintético (SOF) (Hewitt & England, 1999). Desde o início o SOF foi formulado com base na análise bioquímica do oviduto das ovelhas (Tervit, Whittingham, & Rowson, 1972), tornou-se um meio popular de escolha para diferentes espécies. Curiosamente, seu uso como um “tudo em um meio” para maturação oocitária, fertilização e desenvolvimento do embrião foi relatado com sucesso (Gandhi, Lane, Gardner, & Krisher, 2000). Sabendo que as últimas horas de maturação *in vivo* dos CCOs ocorre no oviduto e que essas condições aparentam ser favoráveis para uma maturação oocitária

mais efetiva, o presente estudo tem por objetivo apresentar resultados do impacto do meio de cultivo SOF na MIV e seus efeitos sobre a taxa embrionária.

Em suma, a presente proposta investigou os efeitos da adição do meio SOF durante as últimas 4 horas da maturação oocitária *in vitro* sobre a progressão meiótica e taxa de produção embrionária em bovinos.

Capítulo 1

1. ESTADO DA ARTE

1.1 Aspectos gerais sobre o oviduto

Em termos fisiológicos as fêmeas bovinas se apresentam como poliéstricas não sazonais, com ciclos estrais regulares intervalados em 21 dias. Em condições fisiológicas normais o ciclo possui quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro (Soares & Junqueira, 2018). Além disso, os ovários representam órgãos de relevante estudo, haja vista, que tal órgão está envolvido na endocrinologia reprodutiva e na gametogênese. Neste sentido, a compreensão da dinâmica folicular é indispensável para médicos veterinários que buscam trabalhar com a reprodução bovina (Soares & Junqueira, 2018).

Durante o período de ovulação, o oviduto exibe um papel ativo, em que o lúmen fornece um ambiente adequado para a fertilização e o estrato muscular se contrai ritmicamente para movimentar o ovócito. O fluido do oviduto é capaz de promover um ótimo ambiente para a maturação final do oócito, para a fusão com o espermatozoide e o início do desenvolvimento embrionário, além de servir como reservatório de espermatozoides após a cópula (Kamacı, Suludere, Irmak, Can, & Bayhan, 1999).

O lúmen do oviduto de mamífero pode ser considerado um ambiente ideal para processos reprodutivos incluindo a fertilização e desenvolvimento inicial do embrião (Coy, Garcia-Vazquez, Visconti, & Aviles, 2012). O oviduto é dividido em três estruturas funcionais, a primeira delas é chamada de infundíbulo, no qual se localiza as fímbrias (com forma de franjas), que têm por função captar os oócitos liberados pelo ovário, e onde ocorre o primeiro contato do oócito com o fluido ovidutal. No segmento médio do oviduto, se encontra a ampola, na qual ocorre o principalmente o processo de fertilização. Conectado a ampola, está o

istmo, estrutura que se liga ao corno uterino e capta os espermatozoides, realizando contrações para levá-los até a ampola (Soares & Junqueira, 2018).

1.2 Aspectos do fluido ovidutal e sua interação com o oócito

Em animais monovulatórios, como os bovinos, um complexo *cumulus*-oócito é liberado do folículo pré-ovulatório e então transportado pelo infundíbulo até o lúmen da ampola. O complexo *cumulus*-oócito (CCO), constituído por um oócito envolto por numerosas camadas de células do *cumulus* (Familiari et al. 1998), foi relatado que pequenas alterações no nível de expansão *cumulus* afetam a adesão inicial dos CCO ao epitélio no infundíbulo, dificultando seu transporte (Suarez, 2002). O oócito é então, ovulado na cavidade peritoneal e então transportado ao infundíbulo onde passará por uma maturação nuclear, citoplasmática e molecular (Talbot et al. 1999).

O tempo necessário para a conclusão da primeira divisão meiótica *in vitro* de oócitos bovinos varia de 18 a 24 horas (Hyttel et al., 1989; Süss, Wüthrich, & Stranzinger, 1988). O primeiro evento da maturação nuclear é o processo de rompimento da vesícula germinativa (RVG) que ocorre, *in vitro*, entre sete e 12 horas após o início do cultivo, enquanto a metáfase I (MI) ocorre entre 12 e 15 horas. A anáfase I (AI) e a telófase I (TI) ocorrem entre 15 e 18 horas e a metáfase II (MII), a partir de 18 horas. Mais de 95% dos oócitos apresentam bloqueio em MII entre 22 e 24 horas de cultivo (Bertagnolli et al 2004).

O processo de maturação do CCO envolve a expansão do *cumulus* e modificação da zona pelúcida (ZP). Ocorrendo um aumento da acessibilidade a ZP ao fluido do oviduto e modificações ultraestruturais (Coy et al., 2012; Funahashi et al. 2001). Proteínas e açúcares ligam-se a ZP, contribuindo para interação do espermatozoide com o oócito.

Na fertilização ocorre a união entre os gametas feminino e masculino. Em vacas, o CCO liga-se ao epitélio do oviduto assim que chega à ampola, sendo esse o local da fertilização em bovino (Kölle et al. 2009). Dois componentes essenciais estão envolvidos no transporte do oócito para o local da fertilização: as contrações coordenadas das células musculares lisas ao longo do

comprimento do oviduto e o batimento ciliar das células epiteliais. Se as contrações ovidutais forem alteradas, o oócito não alcançará o local de fertilização (Avilés, Coy, & Rizos, 2015; Dixon et al., 2009). O fluido ovidutal atua em três principais funções: proteção de gametas, orientação de espermatozoides e orientação de óvulos (Ballester et al., 2014; Kumaresan, Johannisson, Humblot, & Bergqvist, 2019). O espermatozoide move-se sem direção até encontrar o oócito ao acaso, estudos *in vivo* mostram que a interação do CCO com o oviduto produz agentes de quimiotaxia e/ou termotaxia (Eisenbach & Giojalas, 2006; Hunter, 2012). Processos que seriam responsáveis por direcionar o espermatozoide para a parte superior do oviduto. Foi sugerido que um gradiente químico mediado pela progesterona produzida pelas células do *cumulus* esteja envolvido (Coy et al., 2012; Eisenbach & Giojalas, 2006; Guidobaldi, Teves, Uñates, & Giojalas, 2012).

No oviduto, seu fluido apresenta um efeito direto sobre o processo de capacitação espermática, motilidade espermática e reação acrossômica, eventos necessários para a fertilização. Tem sido demonstrado que o fluido de oviduto bovino obtido das fases lútea e não lútea, da região da ampola e istmo, tem diferentes efeitos sobre a motilidade, reação acrossômica e fertilidade dos espermatozoides de bovinos (Valleriote et al., 2015). Tem sido sugerido que proteínas do oviduto podem estar envolvidas na modulação da função espermática, capacidade fertilizante e desenvolvimento embrionário inicial (Ghersevich et al., 2015; Valleriote et al., 2015).

Após as células do *cumulus* caírem na pós-fertilização, os embriões pré-implantação usam o metabolismo oxidativo para adquirir energia, principalmente de piruvato e lactato como as principais fontes de energia (Gardner & Leese, 1990). À medida que os embriões continuam se desenvolvendo, o metabolismo glicolítico assume lentamente o controle à medida que as mitocôndrias se tornam maduras. Embriões e oócitos são transportados com velocidade diferente no oviduto da égua e do rato. Assim, a prostaglandina (E2) produzida pelos embriões está envolvida nesse processo. Recentemente, foi relatado que os embriões induzem uma alteração na expressão do gene ovidutal e, conseqüentemente, podem modular seu próprio ambiente (Alminana et al., 2014; Avilés et al., 2015; Suarez, 2002). Essa transição é acompanhada por diferentes

composições de nutrientes à medida que o embrião viaja através do oviduto, maturação das mitocôndrias para permitir que o embrião estabeleça seu próprio metabolismo e uma mudança na tensão do oxigênio paralela a essa mudança no metabolismo (Li et al 2017).

Com isso, demonstra que o oviduto não é um órgão que apenas transporta o zigoto/embrião inicial através do útero, mas que há comunicação entre eles. Os primeiros estágios do desenvolvimento embrionário ocorrem no oviduto, onde o embrião passa em torno de 4 a 5 dias, independentemente da grande diferença no comprimento do oviduto nas várias espécies (Avilés et al., 2015; Pollard et al., 1991).

Importantes eventos ocorrem neste período, sendo o processo de clivagem e a mudança do genoma materno para o genoma embrionário. Qualquer modificação do ambiente cultural que afete qualquer um desses processos pode ter um efeito profundo na qualidade do blastocisto (Lonergan, Monaghan, Rizos, Boland, & Gordon, 1994). Recentemente, alterações das condições de cultura de *in vivo* para *in vitro*, ou o inverso, em um ponto específico do desenvolvimento embrionário precoce, antes ou depois da ativação do genoma embrionário, influencia criticamente os padrões de expressão gênica dos blastocistos (Gad et al., 2012). Qualquer comunicação entre o oviduto e o embrião é finamente regulada, por exemplo, em bovinos, apenas um embrião se desenvolve *in vivo* enquanto *in vitro*, o cultivo de embriões em grupos é necessário para um maior número de blastocistos para seu desenvolvimento (Goovaerts et al., 2009).

Os resultados mostraram que os oócitos bovinos podem ser maturados em meio SOF, e este tratamento teve efeito nos embriões. O Presente estudo sugere que a associação de SOF com BSA em MIV pode ser mais adequada às condições de maturação dos oócitos bovinos. No entanto, este trabalho propôs a substituição do SFB por um meio definido que suporta consistentemente o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV) em taxas similares ou superiores. Estes achados indicam que os oócitos maturados com BSA acrescido de SOF tem condições que impactam nas taxas de blastocistos. Segundo Gandhi et al 2000. Os complexos *cumulus*-oócitos maturados em meio

de maturação padrão (tratamentos controle e SOF199) e SOF/SFB foram totalmente expandidos 24 horas após a maturação, enquanto os oócitos maturados em SOF BSA exibiram expansão *cumulus*-oócitos reduzida. No entanto, não houve diferenças na conclusão da maturação nuclear (metáfase II) entre os tratamentos. Foi utilizado um sistema semi-definido contendo BSA durante toda a maturação, fertilização e cultura que resultou em porcentagens de desenvolvimento e eclosão iguais aos sistemas com soro presente durante a maturação (Gandhi et al 2000).

Portanto o uso de soro fetal bovino (SFB) tem várias desvantagens, pois o soro pode ser tóxico para embriões e cada lote de soro contém diferentes níveis de fatores de crescimento, metabólitos, proteínas e hormônios, tornando impossível padronizar as condições de cultivo dentro de um laboratório. Além disso, o soro é um suplemento quimicamente mal definido que pode ser contaminado por fungos, bactérias, vírus e pode ter variações no soro de lote para lote que podem afetar a reprodutibilidade dos resultados experimentais. Além disso, a adição de soro ao meio pode introduzir constituintes prejudiciais e benéficos, pois o soro tem um efeito bifásico no desenvolvimento embrionário; inibe a clivagem precoce, altera a expressão gênica, mas acelera o desenvolvimento de blastocistos quando está presente desde o início da compactação. Sugerimos o uso de meio BSA acrescentado por SOF nas últimas quatro horas aumenta a taxa embrionária.

2. HIPÓTESE

A adição do meio SOF durante as últimas 4 horas de maturação *in vitro* favorece a maturação oocitária adequada e impacta positivamente a produção de embriões bovinos.

3. OBJETIVO

Estabelecer uma nova estratégia de maturação *in vitro* para oócitos bovinos e investigar os efeitos do meio SOF sobre a progressão meiótica e taxa na produção embrionária.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Investigar o efeito do meio SOF adicionado nas últimas 4 horas de MIV na retomada da meiose de oócitos bovinos;
- 2) Verificar o efeito do meio SOF sobre a taxa de produção embrionária.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Absalón-Medina, V., Butler, W., & Gilbert, R. (2014). Preimplantation embryo metabolism and culture systems: experience from domestic animals and clinical implications. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 31(4), 393-409.
- ADONA, P.R.; DE BEM, T.H.; MESQUITA, L.G. *et al.* Embryonic development and gene expression in oocytes cultured *in vitro* in supplemented pre-maturation and maturation media. *Reprod. Domest. Anim.*, v.46, p.31-8, 2011.
- Aguilar, J., & Reyley, M. (2005). The uterine tubal fluid: secretion, composition and biological effects. *Anim Reprod*, 2(2), 91-105.
- Alminana, C., Caballero, I., Heath, P. R., Maleki-Dizaji, S., Parrilla, I., Cuello, C., . . . Fazeli, A. (2014). The battle of the sexes starts in the oviduct: modulation of oviductal transcriptome by X and Y-bearing spermatozoa. *BMC Genomics*, 15, 293. doi:10.1186/1471-2164-15-293
- Areekijseeree, M., & Veerapraditsin, T. (2008). Characterization of porcine oviductal epithelial cells, cumulus cells and granulosa cells-conditioned media and their ability to induce acrosome reaction on frozen-thawed bovine spermatozoa. *Micron*, 39(2), 160-167.
- Assey, R. J., Hyttel, P., Roche, J. F., & Boland, M. (1994). Oocyte structure and follicular steroid concentrations in superovulated versus unstimulated heifers. *Molecular reproduction and development*, 39(1), 8-16.
- Avilés, M., Coy, P., & Rizos, D. (2015). The oviduct: A key organ for the success of early reproductive events. *Animal Frontiers*, 5(1), 25-31. doi:10.2527/af.2015-0005
- Ballester, L., Romero-Aguirregomezcorta, J., Soriano-Ubeda, C., Matas, C., Romar, R., & Coy, P. (2014). Timing of oviductal fluid collection, steroid concentrations, and sperm preservation method affect porcine in vitro

- fertilization efficiency. *Fertil Steril*, 102(6), 1762-1768 e1761. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.08.009
- Baruselli, P. S., Vieira, L. M., Batista, E. O. S., Ferreira, R. M., Sales, J. N. S., Gimenes, L. U., ... & Bo, G. A. Produção in vivo e in vitro de embrião bovino Atualizações sobre estratégias de produção de embriões. *Anais da XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, 52.
- Bertagnolli, A. C., Gonçalves, P. B. D., Giometti, I. C., Costa, L. F. S., Oliveira, J. F. C., Gonçalves, I. D. V., ... & Borges, L. F. K. (2004). Interação entre células do cumulus e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 56(4), 488-496.
- Blondin, P., Coenen, K., Guilbault, L., & Sirard, M.-A. (1996). Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos. *Theriogenology*, 46(7), 1191-1203.
- Boilard, M., Reyes-Moreno, C., Lachance, C., Massicotte, L., Bailey, J. L., Sirard, M. A., & Leclerc, P. (2004). Localization of the chaperone proteins GRP78 and HSP60 on the luminal surface of bovine oviduct epithelial cells and their association with spermatozoa. *Biol Reprod*, 71(6), 1879-1889. doi:10.1095/biolreprod.103.026849
- Borland, R., Biggers, J., Lechene, C., & Taymor, M. (1980). Elemental composition of fluid in the human Fallopian tube. *Reproduction*, 58(2), 479-482.
- Coy, P., Garcia-Vazquez, F. A., Visconti, P. E., & Aviles, M. (2012). Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction*, 144(6), 649-660. doi:10.1530/REP-12-0279
- David, A., Brackett, B., Garcia, C., & Mastroianni, L. (1969). Composition of rabbit oviduct fluid in ligated segments of the Fallopian tube. *Reproduction*, 19(2), 285-289.
- Dixon, R. E., Hwang, S. J., Hennig, G. W., Ramsey, K. H., Schripsema, J. H., Sanders, K. M., & Ward, S. M. (2009). Chlamydia infection causes loss of pacemaker cells and inhibits oocyte transport in the mouse oviduct. *Biology of reproduction*, 80(4), 665-673.

- DE MATOS, D.G.; HERRERA, C.; CORTVRINDT, R. *et al.* Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine *in vitro* embryo production. *Mol. Reprod. Dev.*, v.62, p.203-209, 2002. .
- Dey, S. R., Deb, G. K., Ha, A. N., Lee, J. I., Bang, J. I., Lee, K. L., & Kong, I. K. (2012). Coculturing denuded oocytes during the *in vitro* maturation of bovine cumulus oocyte complexes exerts a synergistic effect on embryo development. *Theriogenology*, 77(6), 1064-1077.
- Eisenbach, M., & Giojalas, L. C. (2006). Sperm guidance in mammals—an unpaved road to the egg. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(4), 276.
- Gad, A., Hoelker, M., Besenfelder, U., Havlicek, V., Cinar, U., Rings, F., . . . Schellander, K. (2012). Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative *in vivo* and *in vitro* culture conditions. *Biology of Reproduction*, 87(4), 100, 101-113.
- Gandhi, A. P., Lane, M., Gardner, D. K., & Krisher, R. L. (2000). A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Hum Reprod*, 15(2), 395-401. doi:10.1093/humrep/15.2.395
- Gardner, D., & Leese, H. (1990). Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. *Reproduction*, 88(1), 361-368.
- Guemra, S., Monzani, P.S., Santos, E.S., Zanin, R., Ohashi, O.M., Miranda, M.S., & Adona, P.R.. (2013). Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65(6), 1616-1624
- Ghersevich, S., Massa, E., & Zumoffen, C. (2015). Oviductal secretion and gamete interaction. *Reproduction*, 149(1), R1-R14.
- Gonçalves, Rômany Louise Ribeiro; VIANA, João Henrique Moreira. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. In: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Artigo em anais de congresso (ALICE). Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 43, n. 2, p. 156-159, abr./jun. 2019., 2019.

- Goovaerts, I., Leroy, J., Van Soom, A., De Clercq, J., Andries, S., & Bols, P. (2009). Effect of cumulus cell coculture and oxygen tension on the in vitro developmental competence of bovine zygotes cultured singly. *Theriogenology*, 71(5), 729-738.
- Guérin, P., Gallois, E., Croteau, S., Revol, N., Maurin, F., Guillaud, J., & Menezo, Y. (1995). Techniques de récolte et aminogrammes des liquides tubaire et folliculaire chez les femelles domestiques. *Rev Med Vet*, 146(12), 805-814.
- Guidobaldi, H. A., Teves, M. E., Uñates, D. R., & Giojalas, L. C. (2012). Sperm transport and retention at the fertilization site is orchestrated by a chemical guidance and oviduct movement. *Reproduction*, 143(5), 587-596.
- Hasler, J. F. (2014). Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, 81(1), 152-169.
- Hewitt, D. A., & England, G. C. (1999). Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation in vitro. *Anim Reprod Sci*, 55(1), 63-75. doi:10.1016/s0378-4320(98)00162-6
- Hunter, R. H. (2012). Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 87(1), 244-255. doi:10.1111/j.1469-185X.2011.00196.x
- Hyttel, P., Greve, T., & Callesen, H. (1989). Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 38, 35-47.
- Hyttel, P. F. T. C. H., Fair, T., Callesen, H., & Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47(1), 23-32.
- Kamaci, M., Suludere, Z., Irmak, K., Can, C., & Bayhan, H. (1999). Observation of isthmic epithelial cells from fallopian tubes at follicular phase by light and scanning electron microscope. *Eastern Journal of Medicine*, 4(2), 58-60.
- Kumaresan, A., Johannisson, A., Humblot, P., & Bergqvist, A. S. (2019). Effect of bovine oviductal fluid on motility, tyrosine phosphorylation, and acrosome reaction in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*, 124, 48-56. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.09.028

- Leese, H. J., Houghton, F. D., Macmillan, D. A., & Donnay, I. (2001). Metabolism of the early embryo: energy production and utilization *ART and the Human Blastocyst* (pp. 61-68): Springer.
- Li, S., & Winuthayanon, W. (2017). Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *J Endocrinol*, 232(1), R1-R26. doi:10.1530/JOE-16-0302
- Loiola, M. V. G., Chalhoub, M., Rodrigues, A. S., Ferraz, P. A., Bittencourt, R. F., & de Lisboa Ribeiro Filho, A. (2014). Validação de um programa de produção in vitro de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. *Ciência Animal Brasileira*, 15(1), 93-101.
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M., & Gordon, I. (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Molecular reproduction and development*, 37(1), 48-53.
- Lopera-Vasquez R, Hamdi M, Maillo V, et al. Effect of bovine oviductal extracellular vesicles on embryo development and quality *in vitro*. *Reproduction*. 2017;153(4):461–470. doi:10.1530/REP-16-0384
- Mello, R. R. C., Ferreira, J. E., Sousa, S. L. G. D., Mello, M. R. B. D., & Palhano, H. B. (2016). Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. *R. bras. Reprod. Anim.*, 6458-6458.
- Ocampo, L., Celestino Jr, E., Aquino, F., & Ocampo, M. (2016). Developmental competence of water buffalo oocytes in a synthetic oviductal fluid base medium. *Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences*, 6(6), 173-177.
- Pollard, J. W., Plante, C., King, W. A., Hansen, P. J., Betteridge, K. J., & Suarez, S. S. (1991). Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial cells. *Biol Reprod*, 44(1), 102-107. doi:10.1095/biolreprod44.1.102
- Restall, B., & Wales, R. (1966). The fallopian tube of the sheep III. The chemical composition of the fluid from the fallopian tube. *Australian journal of biological sciences*, 19(4), 687-698.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M. P., & Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev*, 61(2), 234-248. doi:10.1002/mrd.1153

- SCHWARZ, K.R.; PIRES, P.R.; DE BEM, T.H. *et al.* Consequences of nitric oxide synthase inhibition during bovine oocyte maturation on meiosis and embryo development. *Reprod. Domest. Anim.*, v.45, p.75-80, 2010.
- Soares, P. H. A., & Junqueira, F. S. (2018). Particularidades reprodutivas da fêmea bovina: Revisão. *PUBVET*, 13, 148.
- Suarez, S. S. (2002). Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Domest Anim*, 37(3), 140-143.
- Süss, U., Wüthrich, K., & Stranzinger, G. (1988). Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured in vitro. *Biology of reproduction*, 38(4), 871-880.
- Tervit, H. R., Whittingham, D. G., & Rowson, L. E. (1972). Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*, 30(3), 493-497. doi:10.1530/jrf.0.0300493
- Valleriote, P., de Carvalho, C. P., Dubeibe, D. F., Mogollón, E. M., & Burla, A. J. (2015). Influência das secreções de células do oviduto cultivadas in vitro sobre a viabilidade de espermatozoides bovinos congelados-descongelados. *Spei Domus*, 11(22).
- Viana, J., Siqueira, L., Palhao, M., & Camargo, L. (2012). Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. *Anim Reprod*, 9(1), 12-18.
- Vignola, A. Regulação da maturação nuclear e expansão das células do cumulus pelas proteínas quinase A e C em oócitos bovinos. *Santa Maria-RS*.
- Vignola, A., Prado, A., Valente, A., Rubim, M., & Gonçalves, P. (1994). Técnicas de coloração cromossômica para estágios específicos da maturação nuclear de oócitos bovinos. *Ciência Rural*, 24(3), 583-589.
- Voronina, E., & Wessel, G. M. (2003). The regulation of oocyte maturation. *Current topics in developmental biology*, 58(401), 53-110.

Capitulo 2

A new approach for using synthetic oviductal fluid (SOF) medium during the end of oocyte *in vitro* maturation and its impacts on bovine embryo development.

Freitas, M. W.¹; Nunes, S. G.¹, Santos, P.H.¹, Franchi, F.F.¹, Castilho, A.C. S^{2*}

¹*University States of São Paulo (UNESP), Institute of Biosciences, Campus Botucatu, Department of Pharmacology, Botucatu, São Paulo, Brazil.*

² *Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil*

*Corresponding author: Universidade do Oeste Paulista, Pró-reitora de Pesquisa e Pós-graduação - Campus II Rodovia Raposo Tavares, km 572 - Bairro Limoeiro CEP 19067-175 - Presidente Prudente – SP, Brasil. E-mail: castilho.anthony@gmail.com

ABSTRACT

The oocytes from *in vitro* embryos production are exposed to numerous factors that lead to a lower rate of embryos when compared to *in vivo* techniques. To improve the embryo quality and the rate of embryo production *in vivo* factors have been implemented in production techniques. The oviductal fluid plays a role in the final oocyte maturation, sperm capacitation, oocyte capture and fertilization, early development of the embryo, and transport of the embryo to the uterus. Consequently, a culture medium similar to the composition of the oviduct fluid was established and tested for its ability to support fertilization and early embryonic development *in vitro*, it is known as synthetic oviductal fluid (SOF). Therefore, the aimed of this work was to establish a new strategy for *in vitro* maturation (IVM) of oocytes from bovine species. For this, COCs were recovered from the ovary of slaughtered cows and *in vitro* matured for 20 hours and then

the treatments were examined for the last 4 hours of maturation: fetal bovine serum (FBS); FBS/SOF; BSA and BSA/SOF. The matured COCs were fertilized and cultured until 8 days after fertilization and the rate of the embryo was analyzed. Significant differences were considered when $p \leq 0.05$. Our data showed that treatment with SOF has no effect on meiosis progression ($p = 0.5944$). However, when analyzed embryonic rates and incorporation of SOF into the BSA medium, SOF is able to modulate the embryonic yields that increases when compared to BSA treatment ($p = 0.0194$).

Keywords: cattle, synthetic oviductal fluid, *in vitro* production (IVP), embryos.

Introduction

It is already known as the quality of *in vitro* produced (IVP) blastocysts remains behind *in vivo* blastocysts based on their morphology, metabolism, gene expression and cryotolerance, making it clear that *in vitro* treatments must be improved (1, 2). New strategies such as changes in culture medium are implemented in an attempt to improve biological processes related to *in vitro* embryo production and quality. Some supplements, such as fetal bovine serum (FBS) or bovine serum albumin (BSA), are commonly used in culture media to improve the optimized conditions (3). However, a paradoxical effect is evident with FBS, because although its presence accelerates embryo development and increases the number of blastocysts produced, the quality is reduced (4).

In view of this, alternative culture media are being evaluated, such as synthetic oviductal fluid (SOF).

The oviductal fluid is a heterogeneous set of some components, such as amino acids, lipids, phospholipids, carbohydrates, glucose, lactate, pyruvate and other

substances not yet identified (5-7). It is produced by oviductal epithelial cells that are also activated, creating a suitable microenvironment for embryo development (8-10)V. This fluid also contains proteins that have positive gamete actions (11).

Thereby, in sheep and cows, a culture medium similar in composition to oviduct fluid was established and tested for its ability to support fertilization and early embryonic development *in vitro* (7), this was called SOF (12). The SOF was formulated based on biochemical analysis of sheep oviduct and is one medium commonly used for bovine embryo culture *in vitro* (13). Interestingly, its use as an "all-in-one medium" for oocyte maturation, fertilization, and developmental embryo has been successfully reported (14).

The oviduct and your secretion are known to promote an adequate environment for final oocyte maturation, sperm capacity for fertilization, transport and early development of the embryo where important morphological and metabolic changes occur, including the first mitotic division and activation of the embryonic genome (15-17).

Thus, the female reproductive tract provides a suitable microenvironment for such roles and makes natural fertilization superior to *in vitro* embryo production in cattle (18). *In vivo*, gametes face drastic endocrine changes in the oviduct that can alter their entire molecular profile, and this interaction between oviduct-gametes is important in generating a better quality embryo (19). This suggests that the addition of oviductal factors and conditions in the culture media may be beneficial for the *in vitro* embryo quality improvement.

So, in the time of oocyte arrived in oviduct, he needs to changes important for a period, In mammals, oogenesis begins during fetal life and oocytes remain in prophase I until a while before ovulation when they resume meiosis (oocyte maturation). This process is initiated with the activation of maturation promoting factor (MPF) leading the oocyte to progress from prophase I to metaphase II (MII). During MII, MPF remains at

high levels maintaining the oocyte held in this stage until fertilization or parthenogenetic activation (20), *in vivo* the time cannot be precisely defined, because there are differences among the same species and between individuals, however, knows if the oocyte spends much of its time in the ovary. In humans, it is about 15-20 hours of maturation in the follicular environment and the rest occurs when the oocyte is in the oviduct in contact with the oviductal fluid (21). The time necessary for the finished of the first *in vitro* meiotic division of bovine oocytes varies from 18 to 24 hours (22, 23). The first event of nuclear maturation is the process of germinal vesicle rupture (GVR) that occurs, *in vitro*, between seven and 12 hours after the beginning of the culture, and the metaphase II (MII) is completed about 18 hours. More than 95% of the oocytes are blocked in MII between 22 and 24 hours of culture (23-26). But we know the maturation is more the meiotic division is too cytoplasmatic and molecular maturation.

Thus, the present study aimed to investigate the effects of SOF treatments *in vitro* maturation in the last four hours, as improve medium maturation, obtaining better results in the rate of the embryos produced.

Material and Methods

Analyse 1: Effects of additions SOF medium during the last 4 hours of IVM on cattle nuclear oocyte maturation.

In vitro oocyte maturation

Pools of 20 COCs were washed and transferred to a 90 µl drop of maturation medium according to the groups. Drops were covered with silicon oil and incubated for 24h at 38.5 °C in humidified air containing 5% CO₂. To evaluate the addition of the SOF medium, it was added at 20 hours of maturation, with the addition of the SOF medium in the last four hours of IVM. Four experimental groups were used:

- 1. FBS:** fetal bovine serum medium with 10% fetal bovine serum, pyruvate (2 µl/ml of solution) for 20 hours and replacement to FBS in the last 4 hours.
- 2. FBS/SOF:** FBS for 20 hours and replacement to FBS/SOF (Botupharma, Botucatu-SP, Brazil), medium SOFaa (holm et al supplemented with myo-inositol, pyruvate, 5 mg/ml BSA (fatty acid-free), without sfb and amikacin sulfate) in the last 4 hours of IVM.
- 3. BSA:** Bovine serum albumin composed of TCM 199 with Earles salts supplemented with pyruvate (2 µg/ml of 100 mM solution), amikacin (75 µg/ml), BSA (4 µg/ml), FSH (1 µg/ml) and LH (2 UI/ml) for 20 hours and replacement to BSA in the last 4 hours.
- 4. BSA/SOF:** BSA (Botupharma, Botucatu-SP, Brazil) for 20 hours and replacement to BSA/SOF (medium SOFaa (holm et al supplemented with myo-inositol, pyruvate, 5 mg/ml BSA (fatty acid-free), without sfb and amikacin sulfate) in the last 4 hours of IVM. in the last 4 hours.

Nuclear maturation analysis in oocytes

Oocytes from four replicates (n= 20/group) were selected and treated with the treatments described above. After 24h of maturation the oocytes were removed from maturation drops, vortexed to remove the *cumulus* cells and submitted to the nuclear analysis with Hoescht 33342 (Sigma). Briefly, oocytes were hed twice in 50 µL microdrop of PBS–PVP and fixed in 50 µL microdrops of 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS for 1 h and then permeabilized in 0.5% (v/v) Triton X-100 containing 0.1% (w/v) sodium citrate for 1 h. Each oocyte was washed thrice in PBS–PVP and incubated in a 7 µL microdrop of Hoescht 33342 (1µg/mL) for 15 min. Oocytes were then mounted in glycerol. Labeling was observed using an epifluorescence microscope (Leica Dx, São Paulo, Brazil). Each oocyte was analyzed for meiosis stage using DAPI filters.

Analyze 2: effects of additions SOF medium during the last 4 hours of IVM on cattle embryo production rates.

In vitro fertilization (IVF) and embryo culture

Semen was thawed at 37 °C for 30s and spermatozoa were washed in a discontinuous Select Sperm[®] gradient (Botupharma, Botucatu-SP, Brazil) under centrifugation at 5000×rpm for 3 min (MiniSpin[®] Eppendorf). The sperm (7 µl of a final concentration 1×10^6 cells/mL) was added into each droplet. Incubation was carried out at 38.5 °C in a saturated humidity atmosphere containing 5% CO₂ for 18 h in IVF medium (Botupharma, Botucatu-SP, Brazil) that contained Tyrode albumin lactate pyruvate (TALP) supplemented with fatty acid free BSA (6 mg/mL), 0.2 mM pyruvate, 30 µg/mL

heparin, 20 μ M penicilamine, 10 μ M hypotaurine, 1 μ M epinephrine, 75 ug/ml ampicillin. Eighteen hours post insemination (considering IFV Day-0), presumptive zygotes were denuded of surrounding cumulus cells using vortex. Embryo culture was performed in synthetic oviduct fluid medium (SOF) (28), supplemented with 2% sodium pyruvate (Sigma–Aldrich), 5% BSA (Gibco) and 2,5% Fetal Bovine Serum (FBS) and 90 μ l drops were maintained under silicon oil in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 38.5 °C. after 3 days of IVF, feeding was done, partially changing the medium, on day 5 post fiv, another feeding was done, partially changing the medium, but with glucose supplementation Afterwards, the plates were maintained 5% CO₂ at 38.5 °C. Blastocyst yields were obtained on day 7 and 8 post insemination; all blastocyst yields were counted.

Statistical analysis

The maturation progression and blastocyst yields data were transformed to arcsine. the results of anormality are avaliated by Shapirowilk and All data were tested by analysis of variance (ANOVA) in COCs and blastocysts were compared with Tukey-Kramer HSD test. When the data did not demonstrate Normal distribution, was used the Kruskall-Wallis test. The analyses were performed with JMP software (SAS Institute, Cary, NC, USA) and the results are presented as mean $\pm$ SEM. Differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

Results

First, when we evaluate cell viability of the oocyte after maturation, using Hoechst test, we did not find impact of treatments on meiosis progression (figure 2). Therefore, SOF does not affect the nuclear maturation of bovine oocytes ($p = 0.5944$).

Moreover, we observed that the yields of blastocysts after the inclusion of SOF in the BSA+SOF group in the last four hours of maturation was higher than in the other experimental groups ($p= 0.0194$, figure 3).

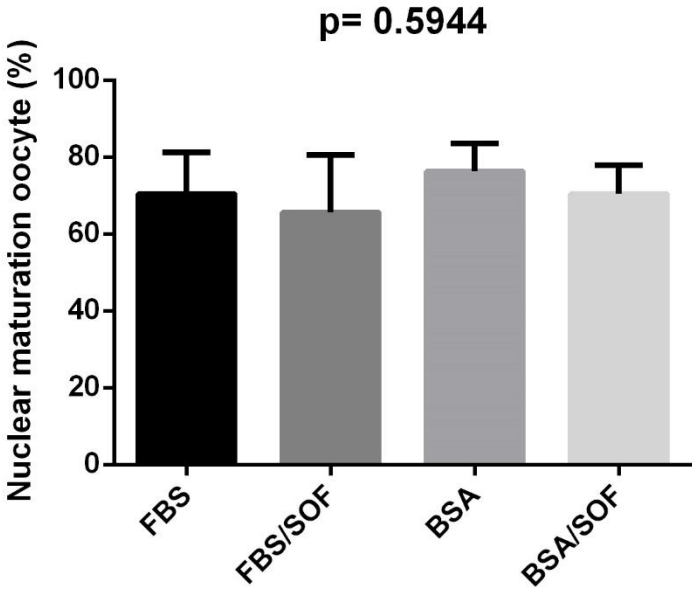


Figure 2. Effect of SOF during the last 4 hours of IVM on meiosis progression. Data are presented in mean $\pm$ SEM. The effects were tested by ANOVA. The results are obtained from 4 replicates ($n=202$ COC). Differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

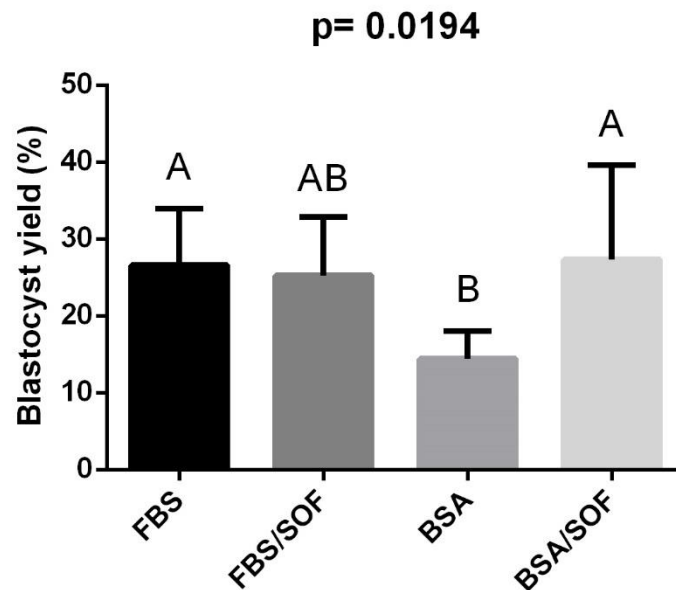


Figure 3. Blastocyst yield (%) after the addition of SOF in the last 4h of IVF. Data are presented in mean $\pm$ SEM. The effects were tested by ANOVA. The results are obtained from 4 replicates (n=20/group). Differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

Discussion

The results showed that bovine oocytes can be matured in a SOF medium, and this treatment had effect in the embryos. The results of the present study suggest that alternating SOF with BSA in IMV may more adequately the conditions to matured oocyte cattle. However, this work proposed the replaced the FBS by defined medium that consistently supports the development of *in vitro*-produced (IVP) bovine embryos at similar or higher rates. These findings indicate that oocytes matured with BSA increased SOF has important conditions that impact in rate blastocysts, removing the necessary the serum from maturation media.

The use of fetal bovine serum (FBS) bears several disadvantages, as serum can be embryo toxic and each batch of serum contains differing levels of growth factors,

metabolites, protein and hormones, making it impossible to standardize culture conditions within a laboratory. Furthermore serum is a chemically ill-defined supplement that can be contaminated by fungi, bacteria, viruses and can have variations in serum from lot-to-lot that can affect the reproducibility of experimental findings (29, 30). Moreover, addition of serum to the medium may introduce detrimental as well as beneficial constituents as serum has a biphasic effect on embryonic development; it inhibits early cleavage, altered gene expression, but accelerates blastocyst development when it is present from the initiation of compaction (3, 31, 32). Thus, at other times of development the use of FBS can be positive, in this work we proved than no requirement to use FBS in matured oocyte.

In the IVP, oocytes return to meiotic maturation when they are removed from the follicle and cultivated in an appropriate medium (33). Inadequate maturation of the oocyte, either of the nucleus or of the cytoplasm, prevents fertilization and increases the occurrence of polyspermy, parthenogenesis and blockage of embryonic development (34). Therefore, the search for adequate IVM means it still the focus of important lines of research.

In this work we suggest the use of BSA medium increased by SOF in the last four hours due to the oviduct oocyte period, however it would be important to evaluate if this effect could be different at other times of maturation and the effects of our treatment on embryos quality.

Conclusion

Our results show that the SOF used in the last four hours of in vitro maturation has positive impacts on bovine embryos, where it is generally assumed that in vitro culture medium is the main factor affecting the quality of the in vitro embryo. (1) However, the

addition of the SOF medium to the usual maturation media did not have a direct effect on maturation, however, maturation in both media has not been shown to have an advantage in either of the two treatments used.

Although the production of blastocyst was favorable, the treatment did not differ statistically between the treatments, but we can cite that the use of BSA medium would be of better benefit than the use of SFB, since the SFB medium, and a medium that has its composition diversified according to the manufacturer, may have changes in its composition, among other disadvantages already cited proving that the BSA+SOF medium can be used as a substitute for bovine fetal serum. However, the use of this medium since the beginning of maturation has not been tested, leaving the hypothesis that there may be a difference in the use of BSA+SOF in the 24 hours of IVM, and not only in the last 4 hours, as was done in this study.

We have studied that the alternation of SOF with BSA in IMV may be more appropriate to the conditions for maturation of bovine oocytes.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the grants 2018/06674-7 from São Paulo Research Foundation (FAPESP), CNPq and CAPES for providing financial assistance.

- 265 1. Viana JHM, Siqueira, L. G. B., Palhao, M. P., & Camargo, L. S. A. Features and
266 perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. *Animal Reproduction*. 2012;V. 9(1):12-8.
- 267 2. Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, de La Fuente J, Lonergan P, Gutierrez-
268 Adan A. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality.
269 *Reprod Domest Anim*. 2008;43 Suppl 4:44-50.
- 270 3. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum*
271 *Reprod Update*. 1995;1(2):91-148.
- 272 4. Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan
273 P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst
274 development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod*. 2003;68(1):236-43.
- 275 5. Mondejar I, Martinez-Martinez I, Aviles M, Coy P. Identification of potential
276 oviductal factors responsible for zona pellucida hardening and monospermy during fertilization
277 in mammals. *Biol Reprod*. 2013;89(3):67.
- 278 6. Coy P, Garcia-Vazquez FA, Visconti PE, Aviles M. Roles of the oviduct in
279 mammalian fertilization. *Reproduction*. 2012;144(6):649-60.
- 280 7. Hunter RH. Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biol Rev*
281 *Camb Philos Soc*. 2012;87(1):244-55.
- 282 8. Avilés M, Coy P, Rizos D. The oviduct: A key organ for the success of early
283 reproductive events. *Animal Frontiers*. 2015;5(1):25-31.
- 284 9. Lamy J, Nogues P, Combes-Soia L, Tsikis G, Labas V, Mermillod P, et al.
285 Identification by proteomics of oviductal sperm-interacting proteins. *Reproduction*.
286 2018;155(5):457-66.
- 287 10. Vatzias G, Hagen DR. Effects of porcine follicular fluid and oviduct-conditioned
288 media on maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro. *Biology of reproduction*.
289 1999;60(1):42-8.
- 290 11. Lachance C, Bailey JL, Leclerc P. Expression of Hsp60 and Grp78 in the human
291 endometrium and oviduct, and their effect on sperm functions. *Hum Reprod*. 2007;22(10):2606-
292 14.
- 293 12. Hewitt DA, England GC. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for
294 canine oocyte maturation in vitro. *Anim Reprod Sci*. 1999;55(1):63-75.
- 295 13. Gandhi AP, Lane M, Gardner DK, Krisher RL. A single medium supports
296 development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Hum Reprod*.
297 2000;15(2):395-401.
- 298 14. Gandhi A, Lane M, Gardner D, Krisher R. A single medium supports development
299 of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human reproduction*.
300 2000;15(2):395-401.
- 301 15. Boilard M, Bailey J, Collin S, Dufour M, Sirard MA. Effect of bovine oviduct
302 epithelial cell apical plasma membranes on sperm function assessed by a novel flow cytometric
303 approach. *Biol Reprod*. 2002;67(4):1125-32.
- 304 16. Li S, Winuthayanon W. Oviduct: roles in fertilization and early embryo
305 development. *J Endocrinol*. 2017;232(1):R1-R26.
- 306 17. Hamdi M, Lopera-Vasquez R, Maillo V, Sanchez-Calabuig MJ, Núñez C, Gutierrez-
307 Adan A, et al. Bovine oviductal and uterine fluid support in vitro embryo development.
308 *Reproduction, Fertility and Development*. 2018;30(7):935-45.
- 309 18. Miller DJ. Review: The epic journey of sperm through the female reproductive
310 tract. *Animal*. 2018;12(s1):s110-s20.
- 311 19. Binelli M, Gonella-Diaza AM, Mesquita FS, Membrive CMB. Sex Steroid-
312 Mediated Control of Oviductal Function in Cattle. *Biology (Basel)*. 2018;7(1).

20. Adona, P. R., & Leal, C. L. V. (2006). Efeito de concentração e tempo de exposição à butirrolactona I na progressão da meiose de oócitos bovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58(3), 354-359.
21. Voronina E, Wessel GM. The regulation of oocyte maturation. Current topics in developmental biology. 2003;58(401):53-110.
22. Süss U, Wüthrich K, Stranzinger G. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured in vitro. *Biology of reproduction*. 1988;38(4):871-80.
23. Hyttel P, Greve T, Callesen H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *Journal of reproduction and fertility Supplement*. 1989;38:35-47.
24. Kruip TA, Cran D, Van Beneden TH, Dieleman S. Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo. *Gamete Research*. 1983;8(1):29-47.
25. Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland M, Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Molecular reproduction and development*. 1994;37(1):48-53.
26. Baez F, Camargo A, Reyes AL, Marquez A, Paula-Lopes F, Vinales C. Time-dependent effects of heat shock on the zona pellucida ultrastructure and in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Reprod Biol*. 2019;19(2):195-203.
27. Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB, et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod*. 2001;64(3):904-9.
28. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003;79(4):829-43.
29. Rauch C, Feifel E, Amann EM, Spotl HP, Schennach H, Pfaller W, et al. Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. *ALTEX*. 2011;28(4):305-16.
30. Mesalam A, Lee K-L, Khan I, Chowdhury M, Zhang S, Song S-H, et al. A combination of bovine serum albumin with insulin–transferrin–sodium selenite and/or epidermal growth factor as alternatives to fetal bovine serum in culture medium improves bovine embryo quality and trophoblast invasion by induction of matrix metalloproteinases. *Reproduction, Fertility and Development*. 2019;31(2):333-46.
31. Murakami M, Dong YJ, Suzuki T, Taniguchi M, Kaedei Y, Sato Y, et al. Development and subsequent cryotolerance of domestic cat embryos cultured in serum-free and serum-containing media. *Cryobiology*. 2011;63(3):170-4.
32. Fernandez-Gonzalez R, Moreira P, Bilbao A, Jimenez A, Perez-Crespo M, Ramirez MA, et al. Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(16):5880-5.
33. Gottardi F, Mingoti G. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. *Rev Bras Reprod Anim*. 2009;33(2):82-94.
34. Mingoti GZ, Garcia JM, Rosa-e-Silva AA. The effect of serum on in vitro maturation, in vitro fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes co-cultured with granulosa cells. *Braz J Med Biol Res*. 1995;28(2):213-7.