



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

Luany Alves Galvão Martinhão

Bióloga

BRASÍLIA - DF

2023

LUANY ALVES GALVÃO MARTINHÃO

**USO DO EXTRATO DE LEVEDURA (YE) COMO ALTERNATIVA AO
SORO FETAL BOVINO (SFB) NO CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
BOVINOS**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Dr. João Henrique Moreira Viana

BRASÍLIA - DF

2023

LUANY ALVES GALVÃO MARTINHÃO

**USO DO EXTRATO DE LEVEDURA (YE) COMO ALTERNATIVA AO
SORO FETAL BOVINO (SFB) NO CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
BOVINOS**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Aprovada em ____/____/2023.

Banca examinadora:

Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana

Profa. Dra. Margot Alves Nunes Dode

Dr. João Gabriel Viana de Grázia

Suplente:

Prof. Dr. Luiz Gustavo Bruno Siqueira

BRASÍLIA - DF

2023

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	vi
AGRADECIMENTOS	vii
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
LISTA DE ANEXOS	xix
CAPÍTULO I	xx
1. INTRODUÇÃO GERAL	21
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE) em bovinos	24
3.2 Suplementação proteica no cultivo <i>in vitro</i> (CIV) de embriões bovinos	28
3.3 Soro fetal bovino (SFB)	29
3.3.1 Processo de fabricação.....	29
3.3.2 Componentes	30
3.3.3 Efeitos negativos na PIVE	32
3.4 Aplicação do extrato de levedura (<i>Yeast Extract – YE</i>).....	33
CAPÍTULO II.....	41
RESUMO.....	42
ABSTRACT	44
1. INTRODUÇÃO.....	46
2. MATERIAIS E MÉTODOS	47
2.1 Animais e local	47
2.2 Desenho experimental.....	47
2.2.1 Ensaio preliminares	47
Ensaio 1: Substituição do BSA e SFB por YE 100 %	47
Ensaio 2: Substituição do SFB por YE 100%, com BSA.....	48
Ensaio 3: Curva doses-resposta (YE 100, 75, 50, 25, 10 e 1%), com BSA	48
2.2.2 Experimento: Uso do YE no CIV	49
2.3 Procedimentos experimentais	49
2.3.1 Coleta dos ovários e recuperação dos CCO imaturos.....	49
2.3.2 Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	51
2.3.3 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	51

2.3.4 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	52
2.3.5 Envase e transferência de embriões	53
2.3.6 Criopreservação de embriões.....	54
2.3.7 Prova de eclosão de embriões em laboratório	54
2.3.8 Análise de atividade mitocondrial	55
2.3.9 Análise do acúmulo de gotas lipídicas.....	57
2.3.10 Análise do número total de células embrionárias	58
2.4 Análise estatística	59
3. RESULTADOS	60
3.1 Ensaios preliminares.....	60
Ensaio 1: Substituição do BSA e SFB por YE 100 %	60
Ensaio 2: Substituição do SFB por YE 100 %, com BSA	60
Ensaio 3: Curva dose-resposta (YE 100, 75, 50, 25, 10 e 1%), com BSA	60
3.2 Experimento: Uso do YE no CIV	62
3.3 Análises qualitativas	64
3.3.1 Atividade Mitocondrial.....	64
3.3.2 Acúmulo de gotas lipídicas.....	65
3.3.3 Contagem do número total de células embrionárias	66
3.3.4. Vitrificação	66
3.3.5 Taxa de gestação.....	68
4. DISCUSSÃO.....	69
5. CONCLUSÃO	72
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
7. APOIO FINANCEIRO.....	74
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
9. ANEXOS.....	78
9.1. Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética	78
9.2 Resumos submetidos à congressos.....	79
9.2.1 49th Annual Conference of the International Embryo Technology Society (IETS)	79
9.2.2 XIV Semana da Biologia de Alta Floresta (SEBAF)	80
9.2.3 XV Semana da Biologia de Alta Floresta (SEBAF).....	81
9.2.4 XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE).....	82
9.2.5 11th International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS).....	83
9.2.6 XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE).....	84

DEDICATÓRIA

À Deus, o autor dos meus dias, com muita gratidão. Me concedeu saúde, disposição, satisfação e o privilégio de aprender, durante todo o período do mestrado. Sua presença é real e essencial em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha amada mãe, Simone Alves da Silva Menezes, meu exemplo de resiliência e infinita fonte de amor. Me ensinou a conduzir a vida com muita fé, dedicação e gratidão. Essa conquista também é sua, mãe! Te amo.

À minha irmã, Laryssa Alves Galvão Ramos (Lala), minha melhor amiga e confidente. Nossas conversas foram de extrema importância neste período. Obrigada por me ouvir e ser a minha companheira de vida.

Ao meu esposo, Everton Gatti Martinhão, meu grande amor. Sem o seu carinho, apoio e compreensão eu não teria realizado esse sonho. Esta é mais uma, das incontáveis e grandiosas conquistas ao seu lado.

À minha família materna, em nome da minha avó, Izaete Moreira de Araújo, meu grande exemplo de cuidado e sabedoria; e paterna, em nome da minha tia, Aldete Galvão Giordani, que independentemente da distância, nunca deixou de transmitir seu amor e torcida por mim. Vocês são a minha base e eu agradeço por tudo!

À minha família Martinhão e aos amigos, que me acolheram em Alta Floresta, MT, que sempre me incentivaram a perseguir os meus objetivos. Nunca me senti sozinha aqui.

Aos que hoje estão em meu coração, meu pai, Adejaimé Lima Galvão (*in memoriam*) e meu avô, José Alves de Araújo (*in memoriam*), por me proporcionarem em vida muitas risadas e me ensinaram a conduzir a vida com mais simpatia. Saudades!

Ao meu amigo e chefe, Dr. João Gabriel Viana de Grázia, por tudo que fez por mim, por nunca medir esforços para me ensinar o que sabe, participou de toda a minha formação profissional e da minha trajetória acadêmica no mestrado. Obrigada por me encorajar a seguir, sempre por bons caminhos.

Ao meu querido orientador, Dr. João Henrique Moreira Viana, pela oportunidade, por me receber como aluna de Pós-Graduação e aceitar conduzir esse trabalho, mesmo à distância. Muito obrigada pela paciência e sua grande contribuição para o meu crescimento, com seu vasto conhecimento. Me sinto muito feliz, honrada e grata por essa orientação.

Aos membros da banca avaliadora, Dr. João Gabriel Viana de Grázia, Profa. Dra. Margot Alves Nunes Dode e Prof. Dr. Luiz Gustavo Bruno Siqueira, pela disponibilidade em contribuir com o meu trabalho.

À Universidade de Brasília e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, por contribuírem para a minha formação acadêmica; e ao Decanato de Pós-Graduação, pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório de Reprodução Animal (LRA) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília, DF, pela oportunidade de realizar parte dos meus experimentos nesta instituição; e em especial ao casal e meus amigos, Letícia Prates Martins de Faria e Otávio Augusto Costa de Faria, por disponibilizem tempo, conhecimento e a casa de vocês para me receber (maravilhosamente bem). Foram dias produtivos de muito aprendizado, faltam palavras para agradecer o que fizeram por este trabalho.

Ao laboratório comercial Norte Embryo (minha segunda casa), por disponibilizar acesso ao espaço físico, aos equipamentos e a todos os materiais necessários para que os experimentos fossem realizados; e aos amigos de profissão, Ismael do Nascimento Garcia e Dhonata Nunes Ribas, pela coleta dos ovários, compreensão, parceria em todos os momentos e pelo café quentinho de todos os dias.

Aos visitantes, profissionais em treinamento e estagiários no laboratório comercial Norte Embryo, pela companhia, preocupação, auxílio e muitos momentos de descontração nessa trajetória, foi um prazer conhecê-los e dividir meu trabalho com vocês, em diversas fases. Amei as trilhas sonoras que embalaram meus experimentos.

À empresa FIVX Apoyar Biotech, em nome do Carlos Nogueira de Góis (Carlinhos), por fornecer apoio técnico e todos os meios da PIVE e criopreservação utilizados neste trabalho; e à empresa De Col Reprodução Bovina, em nome do Felipe Ranzini de Col, por realizar todas as transferências embrionárias e compartilhar os resultados dos diagnósticos de gestação.

“Os Teus olhos viram o meu embrião; todos os dias determinados para mim foram escritos no teu livro antes de qualquer deles existir”.

Salmos 139:16

RESUMO

A bovinocultura é uma das atividades de maior destaque no agronegócio do Brasil. Em 2020, o país liderou a exportador de carne bovina do mundo. Essa realidade só foi alcançada pela multiplicação do número de descendentes de animais de maior valor genético, proporcionado pelo uso intensivo das biotecnologias na área da reprodução animal. No que se refere as biotecnologias, o Brasil tornou-se uma referência na produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE). Ainda que a PIVE na espécie bovina seja uma técnica estabelecida e já utilizada comercialmente, diversos esforços são realizados para melhorar seus indicadores quantitativos e qualitativos. Um das alternativas que tem sido investigada, é o aperfeiçoamento dos meios de cultivo, seja pelo ajuste das propriedades físico-químicas, pela adição de agentes com potencial antioxidantes ou pela suplementação com nutrientes ou fontes de fatores embriotróficos. A suplementação com SFB possui efeitos benéficos no desenvolvimento embrionário *in vitro*, porém sua composição é indefinida e pode variar entre os lotes. O uso do SFB tem sido associado a alterações metabólicas nos embriões, com potencial impacto nos resultados da criopreservação. Além disso, como é um produto de origem animal, há um risco intrínseco de veiculação de patógenos, e existem questões éticas relacionadas ao seu processo de fabricação. Desse modo, torna-se necessário buscar alternativas ao uso do SFB nos sistemas de cultivo. O presente trabalho traz uma revisão sobre a suplementação proteica durante o cultivo *in vitro* de embriões, e apresenta os resultados experimentais do uso do Extrato de Levedura (*Yeast Extract* – YE), como uma nova fonte proteica alternativa para substituir o SFB durante o CIV. O YE é conhecido por melhorar sistemas de cultivos celulares de outros de mamíferos, pois em sua composição há presença de componentes importantes para o metabolismo celular, além de apresentar maior padronização dos lotes e risco sanitário reduzido, quando comparado ao SFB. Para avaliar seu uso no cultivo *in vitro* de embriões, foram avaliadas diferentes estratégias de substituição do SFB. Complexos *cumulus*-oócito (CCO) imaturos de grau I obtidos em abatedouro de ovários de fêmeas da raça *Nelore* foram maturados *in vitro* (MIV) e fertilizados *in vitro* (FIV) e os presumíveis zigotos (n=5.875) foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos, submetidos ao cultivo *in vitro* (CIV) em meio SOF acrescido de BSA (3mg/mL) e suplementados com: G1, 3% SFB (controle positivo); G2, sem suplemento (controle negativo); G3, YE 1% durante todo o CIV; G4, YE 1% até dia 3 e 3% SFB dos dias 3 a 9 de CIV; G5, YE 1% somente até o dia 3 de CIV. Os resultados obtidos demonstram que, o uso do YE 1% (0,1mg/mL), como suplemento, não compromete o desenvolvimento embrionário ou as taxas de gestação pós-transferência à fresco, associado a BSA (3mg/mL) em sistemas sequenciais e com baixa tensão de oxigênio (5,5%), porém o YE

causa maior acúmulo de lipídios no citoplasma e reduz a criotolerância. Portanto, conclui-se que YE 1% é uma alternativa para a substituição do SFB durante o CIV, porém não atenua o acúmulo de lipídeos e seus efeitos negativos na criopreservação dos embriões.

Palavras-chave: Bovinos, meios de cultivo *in vitro*, suplementação proteica, qualidade embrionária.

ABSTRACT

Cattle farming is one of the most prominent activities in agribusiness in Brazil. In 2020, the country led world's beef exports. The intensive use of animal reproduction biotechnologies was key to increase of the number of offspring from sires and dams with greater genetic value, and thus to improve production and productivity. Brazil has become a reference in the use of *in vitro* embryos production in cattle (IVEP). Although IVEP is a well-established technique and has long been used commercially in cattle, several efforts have been made to improve its outcomes. One of the alternatives that has been investigated is to improve culture media, either by adjusting the physicochemical properties, such as by adding antioxidants, or by the supplementation with nutrients or embryotrophic factors. The supplementation with fetal calf serum (FCS) has beneficial effects on *in vitro* embryo development, but its composition is undefined and may vary between batches. Moreover, the use of FCS has been associated with metabolic changes in embryos, with a potential impact on cryopreservation results. Furthermore, as it is a product of animal origin, there is an intrinsic risk of pathogen transmission, and there are ethical issues related to its manufacturing process. Therefore, it is necessary to search alternatives to its use in *in vitro* culture (IVC) systems. The present study provides a review of protein supplementation during IVC of embryos, and presents the experimental results of the use of Yeast Extract (YE), as a new alternative protein source to replace FCS during IVC. YE is known for improving outcomes in other mammal cell culture systems, as its composition contains important molecules for cell metabolism. Moreover, has greater batch to batch standardization, and lower sanitary risks, when compared with FCS. To evaluate its use in embryo IVC, different FCS replacement strategies were evaluated. Grade I immature cumulus-oocyte complexes (COC) recovered at slaughterhouse from Nelore ovaries were *in vitro* matured (IVM) and fertilized (IVF) and the presumptive zygotes (n=5,875) were randomly distributed into five groups, subjected to IVC in SOF medium plus BSA (3mg/mL) added with: G1, 3% FCS (positive control); G2, without supplement (negative control); G3, YE 1% throughout the IVC; G4, 1% YE until day 3 and 3% FCS from days 3 to 9 of IVC; G5, YE 1% only until day 3 of IVC. The results obtained show that the use of YE 1% (0.1mg/mL) as a supplement does not affect embryo development or post-fresh transfer pregnancy rates, when associated with BSA (3mg/mL) and under low oxygen tension (5.5%). However, YE causes greater accumulation of lipids in the cytoplasm and reduces cryotolerance. Therefore, it is concluded that YE 1% is an alternative for replacing SFB during CIV, but it does not attenuate lipid accumulation and its negative effects on embryo cryopreservation.

Keywords: Cattle, *in vitro* culture media, proteic supplementation, embryonic quality.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BE – Blastocisto Eclodido
- BI – Blastocisto Inicial
- BL – Blastocisto
- BSA – *Bovine Serum Albumin* (Albumina Sérica Bovina)
- BX – Blastocisto Expandido
- CCO – Complexo *Cumulus*-Oócito
- CHO – Células de Ovário de Hamster Chinês
- CIV – Cultivo *In Vitro*
- CL – Corpo Lúteo
- D1, D3, D5, etc. – Dia um, três, cinco, etc. do desenvolvimento embrionário
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- Fert-TALP – Meio de Fecundação com solução Tyrode's-Albumina-Lactato-Piruvato
- FIV – Fecundação *In Vitro*
- FSH – Hormônio Folículo Estimulante
- IA – Inseminação Artificial
- IFNT – Interferon Tau
- IgG – Imunoglobulina G
- LH – Hormônio Luteinizante
- LOS – *Large Offspring Syndrome* (Síndrome da Prole Grande)
- LSM – Microdissecação a Laser
- MIV – Maturação *In Vitro*
- MOET – Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões
- OPU – *Ovum Pick-Up* (Aspiração folicular orientada por ultrassonografia transvaginal)
- PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Solução Salina Tamponada com Fosfato)
- PHE – Penicilamina, Hipotaurina e Epinefrina
- PIVE – Produção *In vitro* de Embriões
- PVA – Álcool Polivinílico
- PVP – Polivinilpirrolidona
- SFB – Soro Fetal Bovino
- SOF – *Synthetic Oviduct Fluid* (Fluído de Oviduto Sintético)
- TCM 199 – *Tissue Culture Medium 199* (Meio de Cultura de Tecidos 199)
- YE – *Yeast Extract* (Extrato de Levedura)

YP – *Yeast Peptones* (Peptonas de Levedura)

ZP – Zona Pelúcida

LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Página
01.	Componentes do soro fetal bovino (FBS) em produtos comerciais.....	30
02.	Efeitos negativos do soro fetal bovino (FBS) na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos (PIVE).....	32
03.	Clivagem (D3) e blastocistos (D6 e D7) – Ensaio preliminar 1.....	60
04.	Clivagem (D3) e blastocistos (D6 e D7) – Ensaio preliminar 2.....	60
05.	Clivagem (D3) e blastocistos (D6 e D7) – Ensaio preliminar 3.....	61
06.	Clivagem (D3), blastocistos (D6 e D7) e eclosão (D9) – Experimento: Uso do YE no CIV de embriões.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
01.	Extrato de Levedura (Y1625, 250g, Sigma-Aldrich®)	47
02.	Diluição seriada de YE para uso no meio de CIV (100, 75, 50 ,25, 10 e 1%), em ensaio de curva de doses-resposta.....	48
03.	Aspiração folicular em ovário bovino.....	50
04.	Oócitos bovinos imaturos.....	50
05.	Tubo para maturação <i>in vitro</i> (MIV) de oócitos bovinos.....	51
06.	Oócitos bovinos maturados.....	51
07.	Placa de cultivo <i>in vitro</i> (CIV) de embriões bovinos.....	52
08.	Palhetas contendo os embriões bovinos, lacradas e identificadas.....	53
09.	Haste para vitrificação.....	54
10.	Estação de trabalho para desvitrificação (reidratação).....	55
11.	Placa para lavagem dos blastocistos expandidos em PBS e PVA.....	56
12.	Realização de imagens com microscópio confocal.....	57
13.	Incubação em Triton e coloração com Bodipy.....	58
14.	Microscópio de epifluorescência (Axioplan 2, Zeiss®)	59
15.	Imagens da clivagem no terceiro dia de CIV, no ensaio preliminar 3	61
16.	Imagens dos blastocistos no sétimo dia de CIV, no ensaio preliminar 3	62
17.	Imagens dos blastocistos no sétimo dia de CIV.....	63
18.	Imagens dos blastocistos no nono dia de CIV.....	63
19.	Intensidade de fluorescência mitocondrial (IFM) em embriões no sétimo dia de CIV.....	64
20.	Imagens dos blastocistos no sétimo dia de CIV, corados com MitoTracker DeepRed, observados em microscópio confocal	64
21.	Acúmulo de gotas lipídicas em embriões no sétimo dia de CIV.....	65
22.	Imagens dos blastocistos no sétimo dia de CIV, corados com Bodipy, observados em microscópio confocal,.....	65

23.	Contagem do número total de células em embriões no sétimo dia de CIV	66
24.	Imagens dos blastocistos no sétimo dia de CIV, corados com Hoechst 33342, observados em microscópio de epifluorescência	66
25.	Taxa de eclosão no nono dia de CIV, após desvitrificação (reidratação)	67
26.	Imagens dos blastocistos no sétimo dia de CIV, após desvitrificação (reidratação)	67
27.	Imagens dos blastocistos no nono dia de CIV, após desvitrificação (reidratação)	68
28.	Diagnóstico de gestação aos 28 dias	68

LISTA DE ANEXOS

Anexo	Título	Página
01.	Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética.....	78
02.	49th Annual Conference of the International Embryo Technology Society (IETS).....	79
03.	XIV Semana da Biologia de Alta Floresta (SEBAF).....	80
04.	XV Semana da Biologia de Alta Floresta (SEBAF).....	81
05.	XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE).....	82
06.	11th International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS).....	83
07.	XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE).....	84

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL, OBJETIVOS E REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO GERAL

A bovinocultura é uma das atividades de maior destaque no agronegócio do Brasil. Em 2020, o país possuía o maior rebanho bovino comercial do mundo, representando 14,3% do total mundial, com 217 milhões de cabeças. O país, no mesmo ano, foi o maior exportador de carne bovina, com 2,2 milhões de toneladas e 14,4% do mercado internacional (EMBRAPA, 2021).

Essa realidade em 2020 foi alcançada em decorrência dos ganhos expressivos de produtividade obtidos nas últimas décadas, consequência do aumento no número de descendentes de animais de alto valor e consequente aumento no ganho genético proporcionado pelo uso intensivo das biotecnologias na área da reprodução animal (QUEIROZ, 2012). Dentre estas biotecnologias, o Brasil tornou-se uma referência e um dos principais produtores de embriões bovinos gerados *in vitro*. O ano de 2019 marcou os 20 anos dos primeiros registros da técnica por empresas comerciais no país (VIANA et al., 2020). No ano anterior, em 2018, foram produzidos mais de 400 mil embriões transferíveis (VIANA, 2020), sendo o país o segundo maior produtor de embriões bovinos do mundo. Isso foi resultado de muitos avanços na produção *in vitro* de embriões (PIVE) nas últimas décadas.

A PIVE é uma biotécnica da reprodução animal de terceira geração, conforme categorização proposta por THIBIER (2005), na qual a inseminação artificial (IA) constituiria a primeira geração e a indução de ovulação múltipla e a transferência de embriões (MOET) a segunda geração. A PIVE envolve as etapas de recuperação de oócitos imaturos, maturação *in vitro* (MIV) e fecundação *in vitro* (FIV) dos oócitos e o cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões gerados (GONÇALVES et al., 2008).

No entanto, a eficiência da PIVE em espécies pecuárias, como a espécie bovina, por exemplo, medida como a conversão de complexos *cumulus*-oócito (CCO) imaturos que atingem o estágio de blastocisto, raramente excede o limite de 30 a 40% (RIZOS et al., 2008), ainda na atualidade. Contudo, embriões produzidos *in vitro* possuem qualidade inferior aos embriões produzidos *in vivo* (HANSEN et al., 2010), por essa razão, a proporção dos CCO que não se desenvolvem após a MIV, FIV e CIV é consideravelmente grande.

Portanto, as estratégias mais estudadas para otimizar os resultados da PIVE está a busca por melhores meios de cultivo, seja pelo ajuste das propriedades físico-químicas (pH, osmolaridade, tensão de O₂), pela adição de agentes com potencial antioxidante (TAKAHASHI et al., 2016), ou pelo enriquecimento com nutrientes ou fatores embriotróficos (TRÍBULO et al., 2018).

Essas estratégias buscam por maiores taxas de produção, também por blastocistos com

35 melhor qualidade (LONERGAN & FAIR, 2008) que, conseqüentemente, possui maior
36 resistência à criopreservação (ZULLO et al., 2016), assim como a maior sobrevivência perinatal
37 dos bezerros gerados (RIVERA, 2019). Desse modo, com o passar dos anos, novos sistemas de
38 cultivo foram sendo criados, testados e aperfeiçoados para permitirem otimização do
39 desenvolvimento embrionário *in vitro* (GONÇALVES et al., 2007; BUENO E BELTRAN,
40 2008).

41 Entretanto, o soro fetal bovino (SFB), suplemento comumente utilizado na PIVE, possui
42 componentes essenciais necessários para a proliferação e manutenção celular
43 (CHELLADURAI et al., 2021), e contém baixos níveis de γ -globulinas, que inibem o
44 crescimento celular (YAO & ASAYAMA, 2017), também apresenta algumas limitações, seu
45 uso tem sido associado a síndrome da prole grande (*Large Offspring Syndrome* – LOS) (CHEN
46 et al., 2015), a danos mitocondriais que, causam acúmulo lipídico e diminuição da
47 criotolerância dos embriões produzidos através da PIVE (CROCCO et al., 2013).

48 O SFB também apresenta composição desconhecida, falta de padronização entre os
49 lotes, potencial de transmitir patógenos e restrições relacionadas a ética animal (LEE et al.,
50 2022). Contaminações relativamente generalizadas de diferentes vírus foram encontradas no
51 SFB por Zhang et al. (2022). Portanto, cientistas em todo o mundo estão realizando pesquisas
52 para reduzir ou substituir o uso do SFB em culturas celulares.

53 De forma similar, buscando por uma nova fonte proteica, baseada em vidências de
54 componentes e efeitos benéficos no sistema de cultivo de células de ovário de hamster chinês
55 (CHO) (BUTLER, 2005) e observações do grupo de trabalho do laboratório Comercial Norte
56 Embryo, no município de Alta Floresta, no Mato Grosso, no qual pequenas contaminações
57 acometidas por leveduras nos primeiros dias de CIV não causam prejuízos ao desenvolvimento
58 embrionário, ao contrário do que é observado com a maioria dos demais microrganismos
59 (BIELANSK et. al., 2000).

60

61 **2. OBJETIVOS**

62 **2.1 Objetivo Geral**

63 O objetivo geral deste estudo é avaliar os efeitos da substituição parcial e total de soro
64 fetal bovino por extrato de levedura como potencial fonte alternativa de macromoléculas durante
65 o cultivo *in vitro* de embriões bovinos.

66

67 **2.2 Objetivos específicos**

- 68 • Avaliar o efeito nas taxas de clivagem, produção de blastocistos no sexto e sétimo dia,
69 eclosão e prenhez aos 30 dias dos embriões transferidos à fresco;
- 70 • Avaliar o efeito sobre a criotolerância, estimada com base nas taxas de eclosão dos embriões
71 reidratados, após vitrificação;
- 72 • Avaliar a atividade mitocondrial, quantificar o número de gotas lipídicas e o número total de
73 células dos embriões produzidos.

74 3. REVISÃO DE LITERATURA

75 3.1 Produção *in vitro* de embriões (PIVE) em bovinos

76 Dentre as biotecnologias da reprodução animal, a produção *in vitro* de embriões (PIVE)
77 possui um grande potencial para acelerar o melhoramento genético, além de ser uma grande
78 ferramenta de pesquisa na área da embriologia (CAMARGO, 2006). A década de 80 marcou o
79 início da aplicação prática da PIVE em bovinos, pois em 1981 nasceu o primeiro bezerro
80 produzido *in vitro* (BRACKET et al., 1982).

81 A PIVE envolve um complexo sistema em etapas. Inicialmente, através da técnica de
82 aspiração folicular (*Ovum pick-up*, OPU), ocorre a recuperação dos CCO imaturos (gameta
83 feminino), seguido pela maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) dos CCO
84 maturados e, por fim, o cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões.

85 A OPU em bovinos pode ser realizada em doadoras vivas ou após a sua morte. A
86 metodologia mais utilizada em doadoras vivas é a manipulação e posicionamento dos ovários
87 via palpação retal para que a imagem ultrassonográfica dos folículos possa ser obtida;
88 simultaneamente, uma probe ultrassonográfica microconvexa transvaginal, acoplada a um
89 suporte juntamente com a agulha de aspiração, é utilizada para identificar e aspirar os folículos
90 (CARNEVALE et al., 2004). Após a morte da doadora, geralmente quando são abatidas em
91 frigoríficos, a aspiração dos folículos pode ser feita de forma manual, com o auxílio de agulha
92 hipodérmica e seringa (TRÍBULO et al., 2009).

93 Os folículos ovarianos que são aspirados possuem de 3 a 8mm, pois de acordo com
94 Blondin & Sirard (1995), o diâmetro dos folículos é preditivo da qualidade oocitária, que por
95 sua vez determina o potencial de desenvolvimento embrionário *in vitro*. As condições de
96 cultivo, por outro lado, possibilitam a expressão deste potencial (RIZOS et al., 2002). Após a
97 recuperação dos CCO imaturos, é realizada a classificação morfológica com o auxílio de um
98 estereoscópio (conhecido também como lupa binocular).

99 Uma das formas de classificação é a descrita por Viana (2004), de acordo com o número
100 das camadas de células do *cumulus* e o aspecto do citoplasma, como segue:

- 101 • Grau I: CCO compacto, com três ou mais camadas de células do *cumulus* e citoplasma
102 homogêneo;
- 103 • Grau II: CCO compacto, com uma ou duas camadas de células do *cumulus* e citoplasma
104 homogêneo;
- 105 • Grau III: CCO parcialmente desnudo, mostrando ausência de células do *cumulus* de menos
106 de 1/3 da superfície da zona pelúcida (ZP) e citoplasma homogêneo ou heterogêneo;
- 107 • Grau IV: CCO desnudo (sem células do *cumulus* na maior parte da superfície da ZP) ou

108 degenerado (com vacuolização e encolhimento do citoplasma).

109 Em seguida, os CCO podem ser armazenados em tubos ou em placas de Petri contendo
110 meio de MIV e permanecerão incubados ao longo de 22 a 24 horas em atmosfera gasosa
111 controlada (5,5% de CO₂), em temperatura (38,5°C) e umidade (95%) adequadas. Neste
112 período, os CCO sofrerão modificações citoplasmáticas e moleculares, em sincronia,
113 contribuindo para a completa maturação oocitária, tornando-o competente para ser fecundado
114 (ROELEN, 2020).

115 Os protocolos para a produção dos meios de MIV variam conforme o laboratório, mas
116 de acordo com Gonçalves et al. (2007), o meio de maturação mais utilizado contém TCM 199
117 (*Tissue Culture Medium 199*), suplementado com soro fetal bovino (SFB), hormônio folículo
118 estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), estrogênio, piruvato e antibióticos. Após a
119 maturação dos CCO, os mesmos são realocados para gotas de meio de FIV em placas de Petri,
120 recobertas por óleo mineral, que serão co-incubados na presença de espermatozoides (gameta
121 masculino) viáveis e capacitados, por 18 a 22 horas, nas mesmas condições atmosféricas da
122 MIV. As condições adequadas são importantes para a manutenção da qualidade oocitária e da
123 atividade espermática, que contribui na fecundação dos CCO maturados (GONÇALVES et al.,
124 2008).

125 Na FIV, é mais frequente o uso de sêmen congelado, fornecido por centrais
126 especializadas. Ao descongelar uma dose de sêmen, é necessário separar os espermatozoides
127 viáveis dos demais componentes indesejáveis, como plasma seminal, crioprotetores e
128 espermatozoides mortos ou imóveis. Para selecionar essa fração espermática viável utiliza-se o
129 método de “*Swim Up*” ou o método de gradiente de densidade, geralmente, construídos com
130 Percoll ou Pure Sperm (GONÇALVES et al., 2008).

131 O meio de FIV mais utilizado por vários laboratórios é o Fert-TALP (com solução
132 tyrode’s-albumina-lactato-piruvato), acrescido por heparina e PHE (penicilamina, hipotaurina,
133 epinefrina) (GONÇALVES et al., 2014). Como citados, a heparina é considerada um
134 importante capacitador de espermatozoides (PARRISH, 2014), essa substância é um
135 glicosaminoglicano (polissacarídeos), presente em elevadas concentrações principalmente
136 durante o estro no trato reprodutivo de fêmeas bovinas (GORDON, 1994), local onde ocorre a
137 passagem do espermatozoide antes da FIV. Acredita-se que a heparina promova a capacitação
138 do espermatozoide ao se ligar e induzir alterações nas proteínas da membrana plasmática, dando
139 origem a alterações bioquímicas, ativando canais iônicos, aumentando o cálcio
140 intracitoplasmático, conseqüentemente o pH (BAVISTER, 2002), elevando a fluidez da
141 membrana espermática (LANGLAIS et al., 1988). O PHE mantém a motilidade e a longevidade

142 dos espermatoídeos bovinos, aumentando a produção de blastocistos *in vitro* (KANG et al.,
143 2015).

144 Para completar o processo, os espermatozoides capacitados se ligam por meio de
145 receptores da membrana plasmática a proteínas específicas na ZP do CCO maturado, de
146 maneira a induzir a reação acrossômica (FLORMAN & FIRST, 1988). A reação acrossômica
147 envolve um processo de exocitose que libera enzimas hidrolíticas que facilitam a penetração do
148 espermatozoide na ZP e modificam as membranas da região pós-acrossomal, sítio da interação
149 entre CCO e espermatozoide (SIDHU & GURAYA, 1989).

150 Após a fusão dos pró-núcleos feminino e masculino (singamia) durante a FIV, originam-
151 se os presumíveis zigotos (OLIVEIRA et al., 2014). A partir desse momento, os zigotos são
152 geralmente realocados em gotas de meio de CIV em placas de petri, recobertas por óleo mineral.
153 O CIV tem duração aproximada de sete dias, sendo realizado em atmosfera gasosa controlada
154 (5,5% de CO₂), sob baixa (5,5% de O₂) ou alta (21% de O₂) tensão de oxigênio, em
155 temperatura (38°C) e umidade (95%) adequadas (WRENZYCKI, 2016).

156 Ao longo do desenvolvimento embrionário, na maior parte dos protocolos disponíveis
157 atualmente, é realizada a troca parcial do meio de cultivo (*feeding*), com objetivo de renovar o
158 fornecimento dos componentes, de forma similar ao descrito por Brackett et al. (1989). A
159 escolha de realizar o *feeding* ou não, a formulação do meio, o dia e as demais avaliações do
160 desenvolvimento embrionário podem variar e isso dependerá do protocolo de cada laboratório.

161 Nesse ambiente terão início as primeiras divisões mitóticas, originando os blastômeros
162 (YANAGIMACHI, 1994), processo conhecido como clivagem. Até o estágio de oito células, os
163 blastômeros ainda se encontram arranjados frouxamente, em divisões bem nítidas. A partir
164 desse momento, conforme as divisões avançam, há uma aglomeração de células de forma
165 compacta, pela formação de junções de adesão e de oclusão entre as células (STRINGFELLOW
166 & SEIDEL, 1998) e o embrião alcança o estágio denominado de mórula (ALVES & CRUZ,
167 2002).

168 Após atingir o estágio de mórula, os blastômeros criam um gradiente osmótico que atrai
169 água para o espaço intercelular, criando uma cavidade denominada blastocele. Essa cavidade
170 possui a função de proteger e nutrir o blastocisto, e o início da blastocele caracteriza o estágio
171 de blastocisto inicial (BI). Paralelamente, ocorre o processo de diferenciação celular, quando
172 há a formação do embrioblasto (ou massa celular interna – MCI) e trofoblasto (ROSSANT,
173 2007; 2016). O embrioblasto é formado por células pluripotentes, que possuem capacidade de
174 formar os tecidos que darão origem ao feto, enquanto o trofoblasto é multipotente e formará os
175 tipos celulares da placenta (COCKBURN & ROSSANT 2010; MOURA, 2012).

176 Conforme a blastocele aumenta de tamanho, ocupando gradualmente o espaço
177 perivitelinico, caracteriza-se o estágio de blastocisto (BL) (GONÇALVES et al., 2008). Por
178 fim, o desenvolvimento do trofoblasto e do embrioblasto levam a expansão progressiva da
179 blastocele e redução na espessura da ZP, caracterizando o estágio de blastocisto expandido
180 (BX). Com o rompimento da ZP o embrião atinge o estágio classificado como blastocisto
181 eclodido (BE) (GONÇALVES et al., 2008).

182 No sétimo dia de desenvolvimento embrionário (D7), os blastocistos são classificados
183 de acordo com seu estágio de desenvolvimento e sua qualidade morfológica, conforme descrito
184 no manual da International Embryo Technology Society (IETS, STRINGFELLOW & SEIDEL,
185 1998):

186

187 **Estágio de desenvolvimento:**

- 188 • Mórula – MO;
- 189 • Blastocisto Inicial – BI;
- 190 • Blastocisto – BL;
- 191 • Blastocisto Expandido – BX;
- 192 • Blastocisto Eclodido – BE.

193

194 **Qualidade morfológica:**

- 195 • Excelente: Sem defeitos morfológicos ou extrusões celulares;
- 196 • Bom: Com uma ou poucas células de extrusão;
- 197 • Regular: Maior número de alterações morfológicas ou extrusões celulares;
- 198 • Pobre: Extrusões ou fragmentações comprometendo mais de 50% da massa celular interna
199 (MCI), dificultando a classificação das células viáveis;
- 200 • Degenerado: Comprometimento definido da MCI, com blastômeros de tamanhos variados,
201 apresentando sinais de degeneração, picnose, fragmentação e alteração de cor.

202

203 Essas classificações foram propostas para embriões produzidos *in vivo* e foram
204 normatizadas como forma de auxiliar os profissionais, oferecendo uma referência (IETS,
205 STRINGFELLOW & SEIDEL, 1998). Após a classificação morfológica embrionária, de
206 preferência, blastocistos expandidos e de excelente qualidade são selecionados, criopreservados
207 (por vitrificação ou congelamento lento) e armazenados em botijões de nitrogênio líquido,
208 enquanto aguardam uma futura desvitrificação (reidratação ou descongelamento); ou são
209 envasados, transportados e transferidos à fresco para as receptoras, previamente sincronizadas

210 através de tratamentos hormonais (DODE; RUMPF, 2002; THOMPSON, 2000; HAFEZ &
211 HAFEZ, 2004).

212 Para o sucesso da transferência dos embriões à fresco ou reidratados após a
213 criopreservação, as receptoras devem passar por uma avaliação da presença de corpo lúteo
214 (CL). Essa estrutura é uma glândula endócrina responsável pelo suporte embrionário e
215 manutenção inicial da gestação, formado no ovário da receptora no ciclo natural ou em resposta
216 ao tratamento hormonal utilizado para sincronização. Os animais que não possuem um CL
217 funcional são descartados como receptoras (DANTAS; NUNES; DANTAS, 2018).

218 Após a transferência dos blastocistos, é necessário que haja o rompimento da ZP
219 (eclosão), resultando no alongamento do embrião e resposta as secreções endometriais
220 (CLEMENTE et al., 2009); esse mecanismo em embriões bovinos produzidos *in vivo* ocorre
221 entre os dias 9-12 do desenvolvimento (VEJLSTED, 2006). A produção de *interferon tau*
222 (IFNT) pelo embrião nesta fase é responsável pelo reconhecimento materno da gestação
223 (MANN & LAMMING, 2001). O IFNT atua no endométrio, prevenindo a luteólise, mantendo
224 o CL e, conseqüentemente, a produção de progesterona, principal hormônio da gestação
225 (ROBERTS, 1989).

226

227 **3.2 Suplementação proteica no cultivo *in vitro* (CIV) de embriões bovinos**

228 O meio base de CIV mais utilizado é o SOF (*Synthetic Oviduct Fluid*), inicialmente
229 baseado no fluido do oviduto ovino (TERVIT et al., 1972), suplementado com fontes
230 proteicas, antibióticos e aminoácidos. As fontes proteicas mais utilizadas ainda na atualidade,
231 que auxiliam no crescimento embrionário, são o SFB e a albumina sérica bovina (BSA), de
232 origem animal (GORDON et al., 2003), porém, as diferentes partidas destas proteínas podem
233 variar amplamente os efeitos durante o período do CIV (ALI & SIRARD, 2002), além do uso
234 de diferentes concentrações.

235 A suplementação proteica de SFB (indefinida) possui componentes (LEE et al., 2022) e
236 efeitos benéficos para o crescimento celular na PIVE, durante o desenvolvimento embrionário
237 em bovinos no CIV, resultando em maiores taxas e expansão dos blastocistos no D7,
238 comparados ao cultivo apenas com BSA. (SENA-NETTO et al., 2020) no entanto, o seu uso é
239 controverso (LEE et al., 2022). Duas sociedades científicas publicaram um apelo em 2013 para
240 que o SFB fosse substituído; o pedido foi renovado em 2018 (PILETZ et al., 2018), contudo,
241 ele ainda é utilizado como rotina na maioria dos laboratórios de PIVE.

242 A suplementação proteica de BSA (semi-definida) mesmo resultando em menores taxas
243 de blastocistos em relação ao SFB, preservou a expressão do gene PLAC8 nos embriões à

244 fresco. O gene PLAC8 é um marcador importante da viabilidade embrionária e geralmente é
245 usado para prever a qualidade dos embriões produzidos *in vitro*, sua expressão está relacionada
246 ao desenvolvimento placentário (SENA-NETTO et al., 2020).

247 No entanto, blastocistos e blastocistos expandidos em D7,5 que foram suplementados
248 apenas com BSA possuem menor criotolerância (LEME, 2008); além disso, o BSA não pode
249 ser produzido de forma absolutamente livre de patógenos, pois a irradiação gama ocasiona a
250 sua degradação (GABER, 2005).

251 Na PIVE, especificamente, para evitar o uso do SFB e BSA no meio de CIV,
252 macromoléculas sintéticas (definidas) foram desenvolvidas, como a polivinilpirrolidona (PVP),
253 o álcool polivinílico (PVA) (WRENZYCHI et al., 2001; SERAPIÃO, 2006) e o substituto
254 sintético do soro (SSS) (SAGIRKAYA et al., 2007) para promover o crescimento celular.
255 Porém, também existem limitações para o uso desses compostos, visando à obtenção de boas
256 taxas de embriões na PIVE quando utilizados isoladamente (ALI et al., 2002; LIM et al., 2007
257 e SAYIRKAVA et al., 2007).

258 Portanto, fontes alternativas de macromoléculas de origem animal, segume sendo
259 testadas, como por exemplo, Hosoe et al. (2016) mostrou que, ao substituir o SFB por sericina
260 (proteína obtida através da hidrólise de fibras puras de seda) a 0,05%, produziu-se embriões
261 com número significativamente menor de gotas lipídicas médias e grandes, quando comparados
262 aos desenvolvidos com 5% de SFB, sugerindo que esses embriões apresentem características
263 semelhantes às dos blastocistos desenvolvidos *in vivo*. Contudo, não houve aumento nas taxas
264 de reexpansão e eclosão após a vitrificação-reidratação (HOSOE et al., 2016).

265 Dessa forma, o conhecimento sobre novas substâncias que exerçam a mesma função na
266 suplementação protéica no CIV faz-se necessário, pois o objetivo é diminuir ou extinguir os os
267 riscos e efeitos.

268

269 **3.3 Soro fetal bovino (SFB)**

270 3.3.1 Processo de fabricação

271 O SFB é um subproduto do sangue retirado de feto bovino em abatedouro. O processo
272 de fabricação do SFB é dividido nas seis seguintes etapas, descritas por Lee et al. (2022):

273 1: A fonte é o feto de uma fêmea bovina abatida (em abatedouros para o processamento de
274 carne bovina), sem o conhecimento da gestação;

275 2: A coleta do sangue só pode ser realizado em instalações aprovadas pelo Orgão do Governo,
276 responsável pela supervisão das atividades;

277 3: O sangue coletado é armazenado em embalagem estéril, refrigerado para promover a

278 coagulação e obtenção de soro de alta pureza;
 279 4: O soro é congelado e armazenado até que as etapas subseqüentes sejam realizadas;
 280 5: O soro é filtrado através de uma cadeia de filtração a ser usado para cultura de células
 281 (geralmente filtração tripla de 0,1 μm). Um processo semelhante para remover a potencial
 282 contaminação bacteriana é essencial, mas pode não eliminar completamente os vírus. O soro
 283 pode ser posteriormente esterilizado por irradiação (raios gama), se necessário;
 284 6: Em seguida, o soro é embalado e rotulado, e as amostras são congeladas até o uso no
 285 laboratório. Esse processo reduz a degradação de ingredientes biologicamente ativos que
 286 ajudam no crescimento celular e podem afetar significativamente a qualidade final do SFB.

287

288 3.3.2 Componentes

289 Na década de 1950, quando o SFB foi introduzido nos meios de cultivo celular, pensava-
 290 se que apenas estimularia o crescimento celular (PUCK et al., 1958), posteriormente,
 291 identificou-se que o SFB é rico em vitaminas, fatores de crescimento (CHELLADURAI et al.,
 292 2021), componentes proteicos complexos, nutrientes residuais, hormônios e entre outros, que
 293 são essenciais para a adesão, crescimento e proliferação de várias células (HONN et al.,
 294 1975; VAN DER VALK et al., 2010). Além dos componentes citados, Lee et al. (2022) fizeram
 295 um compilado detalhado dos componentes presentes no SFB identificados ao longo dos anos,
 296 baseado em pesquisas dos grupos de Brunner et al. (2010), Chelladurai et al. (2021), Honn et
 297 al. (1975) e Zheng et al. (2006), que estão listados na Tabela 1.

298

299

Tabela 1. Componentes do soro fetal bovino (FBS) em produtos comerciais.

Categorias	Componentes	
Componentes de proteínas	Proteínas séricas	Albumina Antitrombina-III Fibronectina Globulinas (por exemplo, imunoglobulinas como IgG) Cadeia fetal da hemoglobina beta Cininogênio Laminina Plasminogênio (precursor da plasmina) Fator de crescimento sérico α 1-Antitripsina (inibidor de protease) α 2-HS-Glicoproteína (fetal)
		α 2-Macroglobulina (inibidor de protease) β -2-Glicoproteína I
	Transporte de proteínas	Apolipoproteína Transcortina Transferrina (por exemplo, Hemiferrina)

		<p>α1-Lipoproteína β1-Lipoproteína</p>
	Enzimas	<p>Alanina aminotransferase (ALT/GPT) Fosfatase alcalina Aspartato aminotransferase/transaminase glutâmica oxaloacética (AST/GOT) Fosfodiesterase cíclica 3',5' específica de cGMP (bovina) Lactato desidrogenase Lactoperoxidase</p>
		<p>Fosfoquinase Protrombinase Transaminase γ-Glutamil transferase</p>
	Hormônios	<p>Hormônio Adrenocorticotrópico Corticosteróides Hormônio folículo-estimulante Glucagon Hormônio do crescimento (bovino) Insulina Hormônio luteinizante Hormônio da paratireóide Prostaglandina Fatores glandotrópicos hipofisários Prolactina Testoterona Hormônios da tireóide Tiroxina Vasopressina</p>
	Fatores de crescimento e citocinas	<p>Fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) Fator de crescimento de células endoteliais (ECGF) Fator de crescimento epidérmico (EGF) Fator de crescimento de fibroblastos (FGF)</p>
		<p>Fator de crescimento glial Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (por exemplo, proteína 2 de ligação a IGF, proteína 4 de ligação a IGF, IGF-II)</p>
		<p>Interferons Interleucinas Fator de crescimento nervoso (NGF) Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) Fator de crescimento tipo pré-insulina I Fator de crescimento transformador (TGF) (por exemplo, TGFβ1)</p>
	Ácidos graxos e lipídeos	<p>Colesterol Etanolamina Ácidos graxos livres e ligados a proteínas Fosfatidil Fosfolipídios</p>
		<p>Triglicerídeos</p>
	Carboidratos	<p>Frutose Galactose Glicose Metabólitos glicolíticos Manose</p>

	Ribose
Não proteico/Nitrogênios	Aminoácidos Creatinina Poliaminas Purinas/Pirimidinas Ureia Ácido úrico
Vitaminas	Retinol/ácido retinóico (vitamina A) Ácido ascórbico (vitamina C) Vitamina B-Grupo:
	Biotina Cobalamina Ácido fólico Niacinamida/ácido nicotínico Ácido pantotênico Piridoxina/Piridoxalfosfato Riboflavina Tiamina α -Tocoferol (vitamina E)
Minerais	Ca, Cl, Cr, Cu, F, Fe, I, K, Mn, Mo, Na, Ni, Se, Sn, Zn
Compostos inorgânicos	Fosfato alcalino Fosfato
Outros	Bilirrubina, CO e CO ₂

300

301

3.3.3 Efeitos negativos na PIVE

302

303

304

305

306

307

A utilização do SFB, embora bastante disseminada na PIVE em bovinos (DEL COLLADO et al., 2014), apresenta limitações, por causar efeitos que prejudicam a qualidade desses embriões e por existir questões éticas relacionadas ao seu processo de fabricação, que estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Efeitos negativos do soro fetal bovino (FBS) na produção *in vitro* de embriões (PIVE) em bovinos.

Efeitos negativos	Fonte
Acúmulo anormal de gotas lipídicas e altos níveis de mitocôndrias imaturas em embriões produzidos <i>in vitro</i> que, conseqüentemente, trarão problemas após a criopreservação.	CROCCO et al. (2013)
Associação a síndrome da prole grande (<i>Large Offspring Syndrome – LOS</i>), uma condição de crescimento excessivo observada em fetos e neonatos de ruminantes.	CHEN et al. (2015)
Existem questões éticas associadas ao seu uso, pois é extraído de sangue de fetos bovinos, abatidos ainda durante a gestação.	LEE et al. (2022)
Seus componentes ainda não foram totalmente definidos e sua composição exata pode variar, dependendo da origem do indivíduo.	LEE et al. (2022)
Presença de diferentes vírus (sequências virais pertencentes a <i>Parvoviridae</i> , <i>Flaviviridae</i> , <i>Herpesviridae</i> e <i>Caliciviridae</i>), com implicações para a saúde animal e humana.	ZHANG et al. (2022)

3.4 Aplicação do extrato de levedura (*Yeast Extract* – YE)

Sabe-se que, em outros sistemas *in vitro*, células de mamíferos também são cultivadas em meios suplementados com SFB. Contudo, devido às limitações deste, aumentou a demanda pelo desenvolvimento de substitutos como proteínas purificadas, proteínas recombinantes (FROUD, 1999) ou hidrolisados de proteínas animais (SCHLAEGGER, 1996).

A busca por aditivos para meios de cultura que melhor replicassem os benefícios dos produtos de origem animal provocou um interesse crescente no uso de peptonas (proteína semi-digerida que serve como fonte de nitrogênio e carbono vegetais) (HEIDEMANN et al., 2000; BURTEAU et al., 2003; FARGES et al., 2008) ou extratos de levedura (SUNG et al., 2004; KIM & LEE, 2009). O hidrolisado de levedura é usado como um nome genérico, incluindo extratos de levedura (*Yeast Extract* – YE) e peptonas de levedura (*Yeast Peptones* – YP). Mais precisamente, YE corresponde à fração solúvel em água da levedura autolisada, enquanto YP representa a fração solúvel de proteínas hidrolisadas por enzimas exógenas.

O YE é conhecido por melhorar muito o desempenho da cultura de células em mamíferos, os benefícios do YE verificados por Mosser et al. (2015) revelou que, o YE aumentou as concentrações máximas de células viáveis de ovário de hamster chinês (CHO) recombinantes e a produção de IgG em até 73 e 60%, respectivamente, em comparação com um meio de cultivo de referência. Atualmente, células de mamíferos, como as CHO, são sistemas de expressão mais comuns para produzir anticorpos monoclonais recombinantes (BUTLER, 2005), utilizados para tratar muitas doenças, incluindo alguns tipos de cânceres.

Embora não haja relatos na literatura do uso do YE na PIVE, essa possibilidade não é descartada, pois análises da composição do YE realizadas por Mosser et al. (2015), destacaram a presença de moléculas como aminoácidos, vitaminas, sais, nucleobase e glicose, que são componentes importantes para o metabolismo embrionário, além de apresentar maior padronização de composição e risco sanitário reduzido, quando comparado ao SFB.

A partir dessas informações e observações feitas por nosso grupo de trabalho, onde nota-se que pequenas contaminações cometidas por leveduras até o terceiro dia de desenvolvimento (D3) não causam comprometimento ao sistema de cultivo *in vitro* embrionário, ao contrário do que é observado com a maioria dos demais microrganismos (BIELANSK et al., 2000), formulou-se a hipótese de que o YE pode ser usado como fonte alternativa de macromoléculas durante o desenvolvimento embrionário em bovinos no CIV.

339 **4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 340 ALI, A.; SIRARD, M. Protein kinases influence bovine oocyte competence during short-term
341 treatment with recombinant human follicle stimulating hormone. **Reproduction**, v.130, p.303-
342 310, 2005.
- 343
344 ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid
345 droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture
346 systems using serum-free or serum-containing media. **Mol Reprod Dev**, v.61, p.57-66, 2002.
347
- 348 ALVES, M. S. D.; CRUZ, V. L. B. **Embriologia**, 7ª ed. Belo Horizonte: Imprensa Universitária
349 da UFMG; 2002.
- 350
351 BAVISTER, B. D. Early history of *in vitro* fertilization. **Reproduction**, v.124, p.181-196,
352 2002.
- 353
354 BIELANSKI, A.; DEVENISH, J.; PHILIPPS-TODD, B. Effect of Mycoplasma bovis and
355 Mycoplasma bovigenitalium in semen of fertilization and association with *in vitro* produced
356 morula and blastocyst stage embryos. **Theriogenology**, v.53, p.1213-1223, 2000.
357
- 358 BLONDIN, P. & SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining
359 characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Mol Reprod Devel**, v.41,
360 p.54-62, 1995.
- 361
362 BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DONAWICK, W. J.; EVANS, J. F.;
363 DRESSEL, M. A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of**
364 **Reproduction**, v.27, p.147-158, 1982.
- 365
366 BRACKETT, B. G.; YOUNIS, A. I.; FAYRER-HOSKEN, R. Enhanced viability after *in*
367 *vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentrations of luteinizing
368 hormone. **Fertility and Sterility**, v.52, p.319-324, 1989.
- 369
370 BRUNNER, D.; FRANK, J.; APPL, H.; SCHÖFFL, H.; PFALLER, W.; GSTRAUNTHALER,
371 G. Cultura de células sem soro: O banco de dados online interativo de mídia sem soro. **ALTEX**,
372 v.27, p.53-62, 2010.
- 373
374 BUENO, A. P.; BELTRAN, M. P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Rev Elet Med Vet**,
375 n.11, p.1-7, 2008.
- 376
377 BURTEAU, C. C.; VERHOEYE, F. R.; MOLS, J. F.; BALLEZ, J. S.; AGATHOS, S. N.;
378 SCHNEIDER, Y. J. A fortificação de um meio de cultura celular isento de proteínas com
379 peptonas vegetais melhora o cultivo e a produtividade de uma linha celular CHO produtora de
380 interferon- γ . **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v.39, p.291-296, 2003.
381
- 382 BUTLER, M. Culturas de células animais: conquistas recentes e perspectivas na produção de
383 biofármacos. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.68, p.283-291, 2005.
- 384
385 CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; RAMOS, A. A.;
386 FILHO, V. R. V. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction**, v.3,
387 n.1, p.19-28, 2006.
388

- 389 CARNEVALE, E. M.; SILVA, M. A. C.; MACLELLAN, L. J.; SEIDEL, G. E.; SQUIRES, E.
390 L. Use of parentage testing to determine optimum insemination time and culture media for
391 oocyte transfer in mares. **Reproduction**, v.128, p.623-628, 2004.
392
- 393 CHELLADURAI, K. S.; CHRISTYRAJ, J. D. S.; RAJAGOPALAN, K.; YESUDHASON, B.
394 V.; VENKATACHALAM, S.; MOHAN, M.; VASANTHA, N. C.; CHRISTYRAJ, J. R. S. S.
395 Alternative to FBS in animal cell culture: An overview and future perspective. **Heliyon**,
396 7:e07686, 2021.
397
- 398 CHEN, Z.; HAGEN, D. E.; ELSIK, C. G.; JI, T.; MORRIS, C. J.; MOON, L. E.; RIVERA, R.
399 M. Characterization of global loss of imprinting in fetal overgrowth syndrome induced by
400 assisted reproduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**
401 **of America**, v. 112 (15), p.4618-4623, 2015.
402
- 403 CLEMENTE, M.; DE LA FUENTE J.; FAIR, T.; AL NAIB, A.; GUTIERREZ-ADAN, A.;
404 ROCHE, J. F.; RIZOS, D.; LONERGAN, P. Progesterone and conceptus elongation in cattle: A
405 direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? **Reproduction**, v.138,
406 p.507-517, 2009.
407
- 408 COCKBURN, K.; ROSSANT, J. Making the blastocyst: lessons from the mouse. **Journal of**
409 **Clinical Investigation**, v.120, p.995-1003, 2010.
410
- 411 CROCCO M. C.; KELMANSKY D. M.; MARIANO M. I. Does serum cause lipid-droplet
412 accumulation in bovine embryos produced *in vitro*, during developmental days 1 to 4?. **J Assist**
413 **Reprod Genet.** v.30 (10): p.1377-1388, 2013.
414
- 415 DALCIN, L.; LUCCI, C. M. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios
416 criobiológicos e estado atual. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v.34, n.3, p.149-159, 2010.
417
- 418 DANTAS, K. S. A.; NUNES, C. C. C.; FERREIRA, J; DANTAS, R. A. A. Seleção de
419 receptoras em um programa de transferência de embriões (PIVE) em bovinos no nordeste do
420 Brasil. **Ciência Animal**, n.28, p.1-14, 2018.
421
- 422 DEL COLLADO M.; SARAIVA N. Z.; LOPES F. L.; CRUZ M. H.; GASPAR R. C.;
423 OLIVEIRA C.S.; PERECIN F.; GARCIA J. M. Effects of reduction or replacement of fetal calf
424 serum by other compounds during *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Pesquisa Veterinária**
425 **Brasileira**, v.34 (7), p.689-694, 2014.
426
- 427 DODE, M. A. N.; RUMPF, R. In: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Produção *in***
428 ***vitro* de embriões: eficiência, limitações e perspectivas futuras**, Brasília: [s.n.]: 2002.
429
- 430 EMBRAPA. O agro no Brasil e no Mundo: uma síntese do período de 2000 a 2020. **Secretaria**
431 **de Inteligência e Relações Estratégicas (SIRE)**, 01 de junho de 2021. Disponível em:
432 [https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/62619259/brasil-e-o-quarto-maior-](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/62619259/brasil-e-o-quarto-maior-produtor-de-graos-e-o-maior-exportador-de-carne-bovina-do-mundo-diz-estudo)
433 [produtor-de-graos-e-o-maior-exportador-de-carne-bovina-do-mundo-diz-estudo](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/62619259/brasil-e-o-quarto-maior-produtor-de-graos-e-o-maior-exportador-de-carne-bovina-do-mundo-diz-estudo). Acesso em:
434 04 de junho de 2022.
435
- 436 FARGES, B.; CHENU, S.; MARC, A.; GOERGEN, J. L. Cinética de células CHO produtoras
437 de IFN- γ e outras linhagens celulares industrialmente relevantes em culturas descontínuas
438 suplementadas com colza. **Processo Bioquímico**, v.43, p.945-953, 2008.
439 FLORMAN, H. M. & FIRST, N. L. The regulation of acrosomal exocytosis 1: Sperm

- 440 capacitationis required for the induction of acrosome reaction by the bovine zona pellucida *in*
441 *vitro*. **Dev Biol**, v.128, p.453-463, 1988.
- 442
- 443 FREITAS, V. J. F.; MELO, L. M.; CHAVES, M. S.; TEIXEIRA, D. I. A. Transgenesis and
444 cloning as reproductive biotechniques in small ruminants. **Rev Bras Reprod Anim**, v.45, n.4,
445 p.179-183, 2021.
- 446
- 447 FROUD, S. J. O desenvolvimento, benefícios e desvantagens de meios sem soro. **Suporte de**
448 **Dev Biol**, v.99, p.157-166, 1999.
- 449
- 450 GABER, M. H. Effect of γ -irradiation on the molecular properties of bovine serum albumin.
451 **J. Biosci. Bioeng**, v.100, p.203-206, 2005.
- 452
- 453 GEORGE, F.; VRANCKEN, M.; VERHAEGHE, B.; VERHOEYE, F.; SCHNEIDER, Y. J.;
454 MASSIP, A.; DONNAY, I. Freezing of *in vitro* produced bovine embryos in animal protein-
455 free medium containing vegetal peptones. **Theriogenology**, v.66, p.1381-1390, 2006.
- 456
- 457 GONÇALVES, F. S.; BARRETTO, L. S.; ARRUDA, R. P.; PERRI, S. H.; MINGOTI, G. Z.
458 Heparin and penicillamine-hypotaurine-epinephrine (PHE) solution during bovine *in vitro*
459 fertilization procedures impair the quality of spermatozoa but improve normal oocyte
460 fecundation and early embryonic development. **In vitro cellular & developmental biology.**
461 **Animal**, v.50 (1), p.39-47, 2014.
- 462
- 463 GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H. B.; SANDRI, L. R. S.; FERREIRA, R.;
464 ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Rev Bras**
465 **Reprod Anim**, v.31, p.212-217, 2007.
- 466
- 467 GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à**
468 **Reprodução Animal**, 2ª ed. São Paulo: Roca, 2008.
- 469
- 470 GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**, 2ª ed. London: CABI Publishing,
471 p.548, 2003.
- 472
- 473 GORDON, I. **Oocyte recovery and maturation**, In: Gordon I. Laboratory production of cattle
474 embryos. Wallingford, UK: CAB International, p.30-65, 1994.
- 475
- 476 HAFEZ, B., HAFEZ, E. **Reprodução Animal**, São Paulo: Manole, 2004.
- 477
- 478 HANSEN, P. J.; BLOCK, J.; LOUREIRO, B.; BONILLA, L.; HENDRICKS, K. E. M. Effects of
479 gamete source and culture conditions on the competence of *in vitro*-produced embryos for post-
480 transfer survival in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.59-66, 2010.
- 481
- 482 HEIDEMANN, R.; ZHANG, C.; QI, H.; LARRICK RULE, J.; ROZALES, C.; PARK, S.;
483 CHUPPA, S.; RAY, M.; MICHAELS, J.; KONSTANTINOV, K.; NAVEH, D. O uso de
484 peptonas como aditivos médios para a produção de uma proteína terapêutica recombinante em
485 culturas de perfusão de alta densidade de células de mamífero. **Citotecnologia**, v.32, p.157-
486 167, 2000.
- 487

- 488 HONN, K. V.; SINGLEY, J. A.; CHAVIN, W. Soro bovino fetal: Um padrão
489 multivariado. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.149, p.344-347, 1975.
- 490
- 491 HOSOE, M.; INABA, Y.; HASHIYADA, Y.; IMAI, K.; KAJITANI, K.; HASEGAWA, Y.;
492 IRIE, M.; TERAMOTO, H.; TAKAHASHI, T.; NIIMURA, S. Efeito da sericina suplementada
493 no desenvolvimento, número de células, criosobrevivência e número de gotículas lipídicas em
494 embriões bovinos cultivados. **Anim Sci J**, v.88, p.241-24, 2016.
- 495
- 496 KANG, S. S.; KOYAMA, K.; HUANG, W.; YANG, Y.; YANAGAWA, Y.; TAKAHASHI,
497 Y.; & NAGANO, M. Addition of D-penicillamine, hypotaurine, and epinephrine (PHE)
498 mixture to IVF medium maintains motility and longevity of bovine sperm and enhances stable
499 production of blastocysts *in vitro*. **The Journal of reproduction and development**, v.61 (2),
500 p.99-105, 2015.
- 501
- 502 KESKINTEPE, L.; BURNLEY, C. A.; BRACKETT, B. G. Production of viable bovine
503 blastocysts in defined *in vitro* conditions. **Biology Reproduction**, v.2, p.1410-1417, 1995.
- 504
- 505 KIM, S. H.; LEE, G. M. Desenvolvimento de meio isento de soro suplementado com
506 hidrolisados para a produção de anticorpos terapêuticos em culturas de células CHO utilizando
507 planejamento de experimentos. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.83, p.639-648, 2009.
- 508
- 509 LANGLAIS, J.; KAN, F. W. K.; GRANGER, I.; RAYMOND, L.; BLEAU, G.; ROBERTS, K.
510 D. Identification of sterol acceptors that stimulate cholesterol efflux from human spermatozoa
511 during *in vitro* capacitation. **Gamete Res**, v.20, p.185-201, 1988.
- 512
- 513 LEE, D. Y.; LEE, S. Y.; YUN, S. H.; JEONG, J. W.; KIM, J. H.; KIM, H. W.; CHOI, J. S.;
514 KIM, G. D.; JOO, S. T.; CHOI, I.; HUR, S. J. Review of the Current Research on Fetal Bovine
515 Serum and the Development of Cultured Meat. **Food science of animal resources**, v.42, n.5,
516 p.775-799, 2022.
- 517
- 518 LEME, L. O. **Efeito da fonte protéica durante o cultivo na qualidade e quantidade de**
519 **embriões bovinos produzidos *in vitro***. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina
520 Veterinária, Universidade de Brasília, Dissertação de Mestrado, 2008.
- 521
- 522 LEONI, G. G.; SUCCU, S.; BERLINGUER, F.; ROSATI, I.; BEBBERE, D.; BOGLIOLO, L.;
523 LEDDA, S.; NAITANA, S. Delay on the *in vitro* kinetic development of prepubertal ovine
524 embryos. **Anim. Reprod. Sci**, v.92, p.373-383, 2006.
- 525
- 526 LIM K. T.; JANG G.; KO K. H.; LEE W. W.; PARK H. J.; KIM J. J.; LEE S. H.; HWANG W.
527 S.; LEE B. C.; KANG S. K. Improved *in vitro* bovine embryo development and increased
528 efficiency in producing viable calves using defined media. **Theriogenology**, v.67 (2), p.293-
529 302, 2007.
- 530
- 531 LONERGAN, P. & FAIR, T. *In vitro*-produced bovine embryos: dealing with the warts.
532 **Theriogenology**, v.1, p.17-22, 2008.
- 533
- 534 MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early
535 embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v.121,
536 p.175-180, 2001.
- 537
- 538 MENCHACA, A.; BARRERA, N.; DOS SANTOS NETO, P. C.; CUADRO, F.; CRISPO, M.

- 539 Advances and limitations of *in vitro* embryo production in sheep and goats. **Anim. Reprod**,
540 v.13, p. 273-278, 2016.
541
- 542 MOSSER, M.; KAPEL, R.; CHEVALOT, I.; OLMOS, E.; MARC, I.; MARC, A.; ORIOL, E.
543 Fractionation of yeast extract by nanofiltration process to assess key compounds involved in
544 CHO cell culture improvement. **Biotechnology progress**, v.31, n.4, p.875-882, 2015.
545
- 546 MOURA, M. T. Pluripotency and cellular reprogramming. An. Acad. Pernambuc. **Ciênc.**
547 **Agron**, v.8, p.138-168, 2012.
548
- 549 OLIVEIRA, C. S.; SERAPIÃO, R. V.; QUINTÃO, C. C. R. Biotécnicas da reprodução em
550 bovinos: minicursos ministrados durante o 3º Simpósio “Biotécnicas da Reprodução em
551 Bovinos” no Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica.
552 Brasília: **Embrapa Gado de Leite**, 2014.
553
- 554 PARRISH, J. J. Bovine *In vitro* fertilization: *In vitro* oocyte maturation and Sperm capacitation
555 with heparina. **Theriogenology**, v.81, p.1-12, 2014.
556
- 557 PHILLIPS, P. E. & JAHNKE, M. M. Embryo Transfer (Techniques, Donors, and Recipients).
558 **Vet Clin Food Anim**, 2016.
559
- 560 PILETZ, J. E.; DRIVON, J.; EISENGA, J.; BUCK, W.; YEN, S.; MCLIN, M.; MERUVIA,
561 W.; AMARAL, C.; BRUE, K. Células humanas cultivadas com ou sem substitutos para soro
562 bovino fetal. **Celular Med**, 2018.
563
- 564 PUCK, T. T.; CIECIURA, S. J.; ROBINSON, A. Genetics of somatic mammalian cells: III.
565 Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. **The Journal of**
566 **experimental medicine**, v.108, n.6, p. 945-956, 1958.
567
- 568 QUEIROZ, S. A. Introdução ao melhoramento genético de bovinos de corte. **Guaíba:**
569 **Agrolivros**, 1 de Janeiro de 2012.
570
- 571 RIVERA, R. M. Consequences of assisted reproductive techniques on the embryonic
572 epigenome in cattle. **Reprod Fertil**, v.32, n.2, p.65-81, 2019.
573
- 574 RIZOS D.; CLEMENTE M., BERMEJO-ALVAREZ P.; DE LA FUENTE J.; LONERGAN P.;
575 GUTIERREZ-ADAN A. Consequências das condições de cultura *in vitro* no desenvolvimento
576 e qualidade do embrião. **Reprodução Doméstico Anima**, v.43 (suplemento 4), p.44-50, 2008.
577
- 578 RIZOS, D.; LONERGAN, P.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P. Consequences of
579 bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*:
580 implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol Reprod Deve**, v.61, p.234-248,
581 2002.
- 582 ROBERTS, R. M. A novel group of interferons associated with the early ovine and bovine
583 embryo. **J Interferon Res**, v.9, p. 373-378, 1989.
584
- 585 ROELEN, B. A. J. Bovine oocyte maturation: acquisition of developmental competence.
586 **Reproduction, Fertility and Development**, v.32, p.98-103, 2020.
587

- 588 ROSSANT, J. Making the Mouse Blastocyst: Past, Present, and Future. **Current Topics in**
589 **Developmental Biology**, v.117, p.275-288, 2016.
590
- 591 ROSSANT, J. Stem cells and lineage development in the mammalian blastocyst.
592 **Reproduction, fertility, and development**, v.19, n.1, p.111-118, 2007.
593
- 594 SAGIRKAYA, H.; MISIRLIOGLU, M.; KAYA, A.; FIRST, N. L.; PARRISH, J. J.; MEMILI,
595 E. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture
596 conditions. **Animal reproduction science**, v.101 (3-4), p.225-240, 2007.
597
- 598 SAYIRKAVA H.; MISIRLIOGLU M.; KAYA A.; FIRST N. L.; PARRISH J. J.; MEMILI E.
599 Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture
600 conditions. **Anim. Reprod. Sci**, v.1001, p.225- 240, 2007.
601
- 602 SCHLAEGER, E. J. O hidrolisado de proteína, Primatone RL, é um promotor de crescimento
603 múltiplo econômico de cultura de células de mamífero em meios contendo soro e sem soro e
604 exibe propriedades anti-apoptose. **J Métodos Immunol**, v.194, p.191-199, 1996.
605
- 606 SERAPIÃO, R. V. Sistemas de Cultivo e Qualidade Embrionária. **O Embrião**, p.4-7, 2006.
607 SIDHU, K. S. & GURAYA, S. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome
608 reaction of mammalian spermatozoa. **Int Rev Cytol**, v.118, p.231-280, 1989.
609
- 610 STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual da Sociedade Internacional de**
611 **Transferência de Embriões**, p.112-113, 1998.
612
- 613 SUNG, Y. H.; LIM, S. W.; CHUNG, J. Y.; LEE, G. M. Hidrolisado de levedura como aditivo
614 de baixo custo para meio isento de soro para a produção de trombopoietina humana em culturas
615 em suspensão de células de ovário de hamster chinês. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.63, p.527-
616 536, 2004.
617
- 618 TAKAHASHI, T.; SASAKI, K.; SOMFAI, T.; NAGAI, T.; MANABE, N.; EDASHIGE, K. N.
619 N-Dimethylglycine decreases oxidative stress and improves *in vitro* development of bovine
620 embryos. **J Reprod Dev**, v.62, p. 209-12, 2016.
621
- 622 TERVIT, H. R.; WHITTINGHAM, D. G. E.; ROWSON, L. E. A. Cultura *in vitro* bem-
623 sucedida de óvulos de ovinos e bovinos. **J. Reprod. Fertil**, v.30, p.493-497, 1972.
624
- 625 THIBIER, M. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current
626 methods and perspectives. **Reprod Nutr Dev**, v.45, n.3, p.235-42, 2005.
627
- 628 THOMPSON, J.G. *In vitro* culture and embryometabolism of cattle and sheep embryos - a
629 decade of achievement. **Anim. Reprod. Sci**, v.60-61, p.263-275, 2000.
630
- 631 TRÍBULO, P.; SIQUEIRA, L. G. B.; OLIVEIRA, L. J.; SCHEFFLER, T.; HANSEN, P. J.
632 Identification of potential embryokines in the bovine reproductive tract. **J Dairy Sci**, v.101, n.1,
633 p.690-704, 2018.
634
- 635 VAJTA, G.; RINDOM, N.; PEURA, T. T.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. The effect
636 of media, serum and temperature on *in vitro* survival of bovine blastocysts after open pulled
637 straw (OPS) vitrification. **Theriogenology**, v.52, n.5, p.939-948, 1999.
638

- 639 VAN DER VALK, J.; BRUNNER, D.; DE SMET, K.; FEX SVENNINGSEN, Å.;
640 HONEGGER, P.; KNUDSEN, L. E.; LINDL, T.; NORABERG, J.; PRICE, A.; SCARINO M.
641 L.; GSTRAUNTHALER, G. Otimização de meios de cultura de células quimicamente
642 definidas: Substituindo soro bovino fetal em métodos *in vitro* de mamíferos. **Toxicol In Vitro**,
643 v.24, p.1053-1063, 2010.
644
- 645 VEJLSTED, M.; DU, Y.; VAJTA G.; MADDOX-HYTTEL, P. Post-hatching development of
646 the porcine and bovine embryo-defining criteria for expected development *in vivo* and *in vitro*.
647 **Theriogenology**. v.65, n.1, p.153-165, 2006.
- 648 VIANA, J. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo**
649 **Transf Newsl**, v.38, p.7-26, 2020.
650
- 651 VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in
652 context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v.14, p. 476-
653 481, 2017.
654
- 655 VIANA, J. H.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; FERNANDES, C. A. C.;
656 MARQUES JÚNIOR, A. P. Short intervals between ultrasonographically guided follicle
657 aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the
658 Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, v.84, p.1-12, 2004.
659
- 660 WRENZYCKI, C. Sistemas de cultivo *in vitro*: quão longe estamos das condições ideais? Anais
661 [...] In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, Foz do Iguaçu,
662 v.30, p.155-159, 2016.
663
- 664 WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS, A.; SIRISATHIEN, S.;
665 BRACKETT, B.; NIEMANN, H. Effects of culture system and protein supplementation on
666 mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Human Reproduction**, v.16, n.5,
667 p.893-901, 2001.
668
- 669 YANAGIMACHI, R. Sperm capacitation and gamete interaction. **Journal Reproduction and**
670 **Fertility**, v.38, p.27-33, 1994.
671
- 672 YAO, T.; ASAYAMA, Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current
673 issues. **Reprod Med Biol**, v.16, p.99-117, 2017.
674
- 675 ZHANG, P.; CAO, L.; MA, Y. Y.; SU, B.; ZHANG, C. Y.; LI, Y. P. Metagenomic analysis
676 reveals presence of different animal viruses in commercial fetal bovine serum and
677 trypsin. **Zoological research**, v.43 (5), p.756-766, 2022.
678
- 679 ZHENG, X.; BAKER, H.; HANCOCK, W. S.; FAWAZ, F.; MCCAMAN, M.; PUNGOR, E.
680 JR. Análise proteômica para a avaliação de diferentes lotes de soro fetal bovino como matéria-
681 prima para cultura celular. Parte IV. Aplicação da proteômica na fabricação de medicamentos
682 biológicos. **Biotechnol Prog**, v.22, p.1294-1300, 2006.
683
- 684 ZULLO, G.; ALBERO, G.; NEGLIA G, DE CANDITIIS, C.; BIFULCO, G.; CAMPANILE
685 G.; GASPARRINI, B. L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of
686 bovine *in vitro*-produced embryos. **Theriogenology**, v.85, p.668-97, 2016.

CAPÍTULO II

687

688

689

690

691 SUBSTITUIÇÃO TOTAL E PARCIAL DE SORO FETAL BOVINO (SFB) POR

692 EXTRATO DE LEVEDURA (YE) DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* (CIV) DE

693

EMBRIÕES BOVINOS

RESUMO

694

695 O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar se a substituição do SFB (utilizado a 3%) pelo
 696 extrato de levedura (*Yeast Extract* - YE) a 0,1mg/mL (1%) durante o cultivo *in vitro* (CIV)
 697 influenciaria a produção *in vitro* de embriões bovinos ou as taxas de gestação subsequentes.
 698 Ovários coletados de fêmeas da raça *Nelore* (*Bos taurus indicus*), abatedouro local, foram
 699 transportados para o laboratório. Complexos *cumulus*-oócito (CCO) imaturos, grau I, foram
 700 utilizados em ensaio preliminar e no experimento, nos quais a maturação *in vitro* (MIV) e
 701 fertilização *in vitro* (FIV) foram realizadas por 22h e 20h, respectivamente. Para a FIV, utilizou-
 702 se doses de sêmen de touros da raça *Aberdeen Angus*. Foi realizado inicialmente um pré-
 703 experimento para a definição da concentração de YE a ser utilizada (1%). Após esta etapa, os
 704 presumíveis zigotos (n=5.875) foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos distintos,
 705 todos submetidos ao cultivo *in vitro* (CIV) em meio SOF acrescido de BSA (3mg/mL) dos dias
 706 1 a 9, e suplementados com: G1, 3% SFB (controle positivo); G2, sem suplemento (controle
 707 negativo); G3, YE 1% durante todo o CIV; G4, YE 1% até dia 3 e 3% SFB dos dias 3 a 9 de
 708 CIV; G5, YE 1% somente até o dia 3 de CIV. As variáveis foram analisadas utilizando o Proc
 709 GLIMMIX (SAS Institute), considerando os efeitos do tratamento, réplica e interação; os
 710 resultados foram apresentados em média±erro padrão. Não houve diferença entre os grupos nas
 711 taxas de clivagem (P=0,6424). A taxa de blastocisto do G4 foi semelhante (P>0,05) à do G1, e
 712 maiores (P=0,0016) que as obtidas nos grupos G2, G3 e G5, sem suplementação com SFB
 713 (47,4%±0,8a vs. 43,6%±0,9ab; 29,8%±0,7b; 32,8%±0,6b e 30,0%±0,9b, respectivamente). As
 714 taxas de eclosão à fresco de G1 (74,0%±0,8a), G4 (76,0% ±0,8a) e G5 (70,0%±0,8a) foram
 715 similares entre si e superiores (P=0,0001) em relação ao obtido no G2 (48,2%±0,5b), enquanto
 716 o G3 (61,8%±0,7ab) não diferiu dos demais tratamentos. Não houve diferença entre os grupos
 717 na intensidade do sinal de fluorescência, utilizado como indicador de atividade mitocondrial
 718 (P=0,1907). O acúmulo de gotículas lipídicas no grupo sem suplementação (G2, 7,6%±1,1a)
 719 foi semelhante (P>0,05) ao observado com YE 1% apenas até o D3 (G5, 9,6%±1,2ab) porém
 720 menor (P=0,0001) do que nos grupos suplementados com SFB durante todo o CIV (G1,
 721 14,8%±1,3bc), YE 1% durante todo o CIV (G3, 15,5%±1,5bc) ou YE 1% até dia 3 e 3% SFB
 722 dos dias 3 a 9 de CIV (G4, 17,2%±2,3c). Não houve diferença entre os grupos G1, G2, G3, G4
 723 e G5 (141±10,0a; 147±8,8a; 164±8,9a; 153±10,0a e 141±9,0a, respectivamente; P=0,3969), em
 724 relação ao número total de células embrionárias. Quando o SFB foi usado ao longo de todo CIV
 725 (G1) as taxas de eclosão após a vitrificação foram maiores do que em G2, G3, G4 ou G5
 726 (78,9%±6,0a vs. 39,4%±7,0b; 46,6%±7,0b; 51,3%±8,0b e 32,8%±8,0b, respectivamente;
 727 P=0,0001). A taxa de gestação após a transferência dos embriões foi semelhante entre os três

728 grupos selecionados, G1, G4 e G5 ($58,6 \pm 10,0a$; $58,0 \pm 7,0a$ e $58,8 \pm 12,0a$, respectivamente;
729 $P=0,9738$). Conclui-se que, os efeitos potenciais da YE 1% durante o CIV dependem do
730 momento da suplementação. O YE 1% pode ser utilizado em sistemas de cultivo sequenciais
731 visando a substituição parcial ou total do SFB, contudo seu uso foi associado ao maior acúmulo
732 de lipídios e redução da crioresistência.

733
734 **Palavras-chave:** Bovinos, meios de cultivo *in vitro*, suplementação proteica, qualidade
735 embrionária.

ABSTRACT

736

737 The aim of the present study was to evaluate whether replacing FCS (3%) with yeast extract
738 (YE) at 0.1mg/mL (1%) during *in vitro* culture (IVC) would affect the *in vitro* production of
739 bovine embryos or subsequent pregnancy rates. Ovaries collected from Nelore females (*Bos*
740 *taurus indicus*) at a local slaughterhouse were transported to the laboratory. The recovered grade
741 I immature cumulus-oocyte complexes (COC) were used in a preliminary essay and on the
742 experiment, in which *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (IVF) were performed
743 for 22h and 20h, respectively. For IVF, doses of semen from Aberdeen Angus breed sires were
744 used. The preliminary essay was initially carried out to define the concentration of YE to be
745 used (1%). Then, presumptive zygotes (n=5,875) were randomly distributed into five distinct
746 groups, all submitted to *in vitro* culture (IVC) in SOF medium plus BSA (3mg/mL) from days
747 1 to 9, supplemented with: G1, 3% FCS (positive control); G2, no supplement (negative
748 control); G3, YE 1% throughout the IVC; G4, 1% YE until day 3 and 3% FCS from days 3 to
749 9 of IVC; G5, YE 1% only until day 3 of IVC. The variables were analyzed using Proc
750 GLIMMIX (SAS Institute), considering the effects of treatment, replicate and their interaction.
751 The results were shown as mean±SEM. Cleavage rate was similar among groups (P=0.6424).
752 The blastocyst rate in G4 was similar (P>0.05) to that in G1, and higher (P=0.0016) than in
753 groups G2, G3 and G5 (47.4%±0.8a vs. 43.6%±0.9ab; 29.8%±0.7b; 32.8%±0.6b and
754 30.0%±0.9b, respectively). The fresh hatching rates were similar in G1 (74.0%±0.8a), G4
755 (76.0%±0.8a) and G5 (70.0%±0.8a), but greater (P=0.0001) than in G2: (48.2%±0.5b), whereas
756 G3 (61.8%±0.7ab) did not differ from the other treatments. The intensity of the fluorescence
757 signal, indicator of mitochondrial activity, was similar among groups (P=0.1907). The
758 accumulation of lipid droplets in the group without supplementation (G2, 7.6%±1.1a) was
759 similar (P>0.05) to that observed with YE 1% only until D3 (G5, 9.6%±1.2ab) but lower
760 (P=0.0001) than in the groups supplemented with FCS during the entire IVC (G1,
761 14.8%±1.3bc), YE 1% during the entire IVC (G3, 15.5%±1.5bc) or 1% YE until day 3 and 3%
762 FCS from days 3 to 9 of IVC (G4, 17.2%±2.3c). There was no difference between groups G1,
763 G2, G3, G4 and G5 (141±10.0; 147±8.8; 164±8.9; 153±10.0 and 141±9.0, respectively;
764 P=0.3969), in the total number of embryonic cells. When FCS was used throughout the entire
765 IVC (G1), hatching rates after vitrification were higher than in G2, G3, G4 or G5 (78.9%±6.0a
766 vs. 39.4%±7.0b; 46.6%±7.0b; 51.3%±8.0b and 32.8%±8.0b, respectively; P=0.0001). The
767 pregnancy rate after embryo transfer was similar among the selected groups, G1, G4 and G5
768 (58.6±10.0; 58.0±7.0 and 58.8±12.0, respectively; P=0.9738). In summary, the potential effects
769 of YE 1% during IVC depend on the timing of supplementation. YE 1% can be used in

770 sequential cultivation systems aiming to partially or completely replace FCS, however its use
771 was associated with greater lipid accumulation and reduced cryotolerance.

772

773

774 **Keywords:** Cattle, *in vitro* culture media, proteic supplementation, embryonic quality.

775 1. INTRODUÇÃO

776 A produção *in vitro* de embriões (PIVE) em bovinos é uma biotecnologia da reprodução
777 animal que, possui um grande potencial para acelerar o melhoramento genético, além de ser
778 uma grande ferramenta de pesquisa na área da embriologia (CAMARGO, 2006). A PIVE
779 envolve um complexo sistema em etapas. Inicialmente, através da técnica de aspiração folicular
780 (*Ovum pick-up*, OPU), ocorre a recuperação dos CCO imaturos, seguido pela maturação *in vitro*
781 (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) dos CCO maturados e, por fim, o cultivo *in vitro* (CIV) dos
782 embriões.

783 Embora A PIVE em bovinos tenha atingido escala comercial, existem problemas em
784 relação a qualidade dos embriões produzidos. Um dos componentes que afetam a qualidade dos
785 embriões é o uso do soro fetal bovino (SFB) na PIVE, este suplemento proteico que é
786 amplamente utilizado em cultura de células e tecidos de origem animal (VAN DER VALK,
787 2022) e também durante a PIVE em bovinos (GORDON, 2003).

788 O SFB está associado a maiores taxas de embriões, mas também com menor
789 criotolerância (CROCCO et al., 2013), associação a síndrome da prole grande (CHEN et al.,
790 2015), risco sanitário (ZHANG et al., 2022), possuir componentes indefinidos e levantar
791 questões éticas associadas por ser um subproduto de origem animal (LEE et al., 2022).

792 Ao longo de vários anos, pesquisadores testaram diferentes suplementos proteicos
793 (WRENZYCHI et al., 2001; SERAPIÃO, 2006; SAGIRKAYA et al., 2007; LEME, 2008;
794 HOSOE et al., 2016; SENA-NETTO et al., 2020), como possíveis alternativas para substituir
795 ou reduzir o SFB na PIVE, porém com sucesso limitado. Em análise recente, revelou que ainda
796 há escassez de pesquisas sobre a composição completa do SFB (LEE et al., 2022), dificultando
797 alcançar uma reprodutibilidade superior ou similar ao produto.

798 A partir de observações do nosso grupo de trabalho, constatou-se que pequenas
799 contaminações por leveduras até o D3 não causam prejuízo perceptível ao desenvolvimento
800 embrionário durante o CIV. Como o extrato de levedura (*Yeast Extract* – YE) é conhecido por
801 melhorar o desempenho do cultivo celular em mamíferos (MOSSER et al., 2015), hipotetizou-
802 se que, este pode ser uma possível fonte alternativa de macromoléculas para uso como
803 suplemento substituto parcial ou total do SFB, durante o CIV.

804 Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a substituição parcial ou total do
805 SFB pelo YE, durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos, considerando os efeitos sobre o
806 desenvolvimento embrionário (clivagem, blastocistos e eclosão) e prenhez aos 28 dias pós-
807 transferência; assim como indicadores indiretos de qualidade como criotolerância, atividade
808 mitocondrial, acúmulo de gotas lipídicas no citoplasma e número total de células dos embriões.

809 2. MATERIAIS E MÉTODOS

810 2.1 Animais e local

811 O presente trabalho foi realizado município de Alta Floresta, localizado no extremo
812 norte do estado de Mato Grosso, Brasil, e na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,
813 localizada em Brasília, DF, Brasil. Os procedimentos experimentais foram submetidos e
814 aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Recursos Genéticos e
815 Biotecnologia (Protocolo CEUA - Cenargen 006/2022; Anexo 1). As atividades realizadas em
816 rebanhos privados também tiveram a anuência formal dos responsáveis.

817

818 2.2 Desenho experimental

819 Os procedimentos que antecedem o CIV (coleta dos ovários, recuperação dos CCO
820 imaturos, MIV e FIV) foram iguais para todos os ensaios e réplicas. Devido à ausência de
821 referências sobre o uso de YE na PIVE, foram realizados três ensaios preliminares para a
822 avaliação da possível toxicidade e definição da dose a ser utilizada no experimento. A diluição
823 inicial foi baseada conforme a descrição do produto (10mg de YE em 1mL de H₂O - água pura,
824 obtida por meio de processos de destilação ou deionização), da marca Sigma-Aldrich® (Saint
825 Louis, Missouri, EUA), código Y1625 (Figura 1). Portanto, a concentração de 10mg de YE foi
826 diluída em 1mL de meio de CIV e foi denominada a referência de 100%.

827



828

829

Figura 1. Extrato de Levedura (Y1625, 250g, Sigma-Aldrich®). **Fonte:** Sigmaaldrich.com.

830

831

832

2.2.1 Ensaios preliminares

833

Ensaio 1: Substituição do BSA e SFB por YE 100 %

834

Avaliou-se o desenvolvimento embrionário ao substituir o SFB e BSA por YE 100% no
835 meio de CIV. Os presumíveis zigotos foram cultivados em dois grupos distintos:

- 836 • G1: SOF acrescido de 10mg/mL de YE, sem BSA e SFB (YE 100%, sem BSA e SFB);
 837 • G2: SOF acrescido de 3mg/mL BSA e 30 μ L/mL (3%) de SFB (Controle positivo - CP).

838

839 Ensaio 2: Substituição do SFB por YE 100%, com BSA.

840 Avaliou-se o desenvolvimento embrionário ao substituir o SFB por YE 100% no meio
841 de CIV. Os presumíveis zigotos foram cultivados em dois grupos distintos:

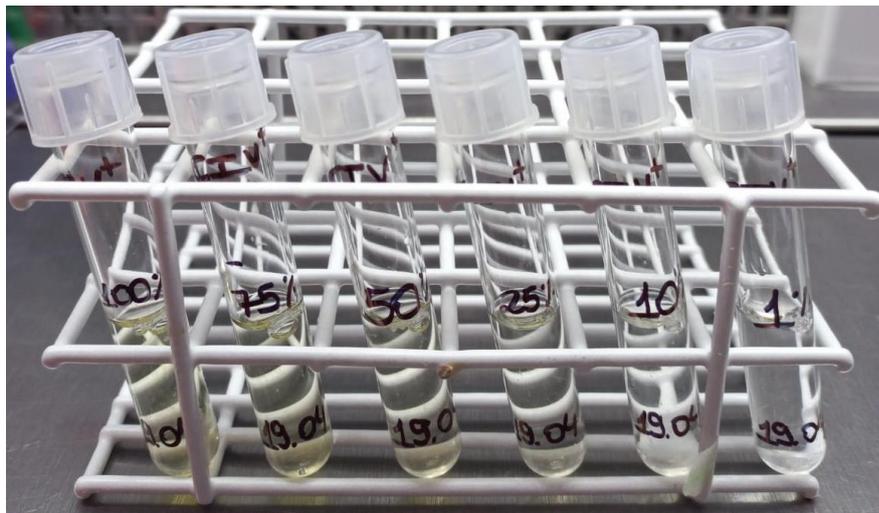
- 842 • G1: SOF acrescido de 10mg/mL de YE, 3mg/mL de BSA, sem SFB (YE 100%);
 843 • G2: SOF acrescido de 3mg/mL BSA e 30 μ L/mL (3%) de SFB (Controle positivo - CP).

844

845 Ensaio 3: Curva doses-resposta (YE 100, 75, 50, 25, 10 e 1%), com BSA

846 Avaliou-se o uso de concentrações decrescentes de YE (curva doses-resposta) no meio
847 de CIV (Figura 2).

848



849

850

851 **Figura 2:** Diluição seriada de YE para uso no meio de CIV (100, 75, 50, 25, 10 e 1%), em ensaio de curva de
 852 doses-resposta. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2022.

853

Portanto, os presumíveis zigotos foram cultivados em oito grupos distintos:

- 854 • **G1:** SOF acrescido de 3mg/mL de BSA e 30 μ L/mL (3%) de SFB (Controle positivo - CP);
 855 • **G2:** SOF acrescido de 3mg/mL de BSA (Controle negativo - CN);
 856 • **G3:** SOF acrescido de 3mg/mL de BSA e 10mg/mL de YE, sem SFB (YE 100%);
 857 • **G4:** SOF acrescido de 3mg/mL de BSA e 7,5mg/mL de YE, sem SFB (YE 75%);
 858 • **G5:** SOF acrescido de 3mg/mL de BSA e 5,0mg/mL de YE, sem SFB (YE 50%);
 859 • **G6:** SOF acrescido de 3mg/mL de BSA e 2,5mg/mL de YE, sem SFB (YE 25%);
 860 • **G7:** SOF acrescido de 3mg/mL de BSA e 1mg/mL de YE, sem SFB (YE 10%);
 861 • **G8:** SOF acrescido de 3mg/mL de BSA e 0,1mg/mL de YE, sem SFB (YE 1%).

862 2.2.2 Experimento: Uso do YE no CIV

863 O experimento estava condicionado ao resultado dos ensaios preliminares, a partir do
864 resultado do ensaio preliminar 3, foi definido que o experimento utilizaria YE na concentração
865 de 1%. Os presumíveis zigotos foram então distribuídos em 5 grupos distintos, todos cultivados
866 em meio SOF acrescido de 3mg/mL de BSA e:

- 867 • **G1:** 30µL/mL (3%) de SFB em todo o CIV (CP)
- 868 • **G2:** Sem suplementação em todo o CIV (CN);
- 869 • **G3:** 0,1mg/mL (1%) de YE em todo o CIV (YE 1%);
- 870 • **G4:** 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e 30µL/mL (3%) de SFB até o D9 (YE 1% + CP);
- 871 • **G5:** 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e sem suplementação até o D9 (YE 1% + CN).

872

873 Após a avaliação das taxas de clivagem e de blastocistos, os embriões obtidos no D7
874 foram subdivididos para as análises qualitativas (acúmulo das gotas lipídicas, atividade
875 mitocondrial e a contagem do número total de células embrionárias), avaliação da taxa de
876 eclosão até o D9, avaliação de criotolerância pela vitrificação, desvitrificação/reidratação e
877 cultivo do D7 ao D9, ou avaliação das taxas de gestação subsequentes a transferência para
878 receptoras previamente sincronizadas nos grupos selecionados com base nos resultados
879 anteriores (G1, G4 e G5).

880

881 2.3 Procedimentos experimentais

882 2.3.1 Coleta dos ovários e recuperação dos CCO imaturos

883 A coleta dos ovários foi realizada em um abatedouro no município de Alta Floresta,
884 MT. Após a coleta, os ovários de vacas da raça nelore (*Bos taurus indicus*), foram transportados
885 em garrafa térmica com solução fisiológica, em temperatura ambiente, até o laboratório Norte
886 Embryo, no mesmo município.

887 Ao chegarem no laboratório, os ovários foram mantidos em temperatura de 38°C, em
888 solução fisiológica, para a recuperação dos CCO imaturos através da aspiração folicular (Figura
889 3), com o auxílio de seringa (10mL) e agulha hipodérmica descartável (40x1,20mm).



Figura 3. Aspiração folicular em ovário bovino. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2022.

890
891
892

893 O líquido folicular, com os CCO imaturos, foi depositado em tubo cônico (50mL),
894 contendo 5mL de solução fisiológica, aquecida a 38°C. Para facilitar a identificação e
895 recuperação dos CCO imaturos do fluido folicular aspirado, foi realizada a retirada de 15mL
896 do sobrenadante, por quatro vezes, com o auxílio de solução fisiológica aquecida a 38°C,
897 preservando o *pelet* (pequena porção) que continha os CCO imaturos.

898 Apenas CCO de grau I e grau II (Figura 4), seguindo a classificação morfológica descrita
899 por Viana et al. (2004), de acordo com o aspecto do citoplasma e do número de células do
900 *cumulus*, foram recuperados e reservados.

901

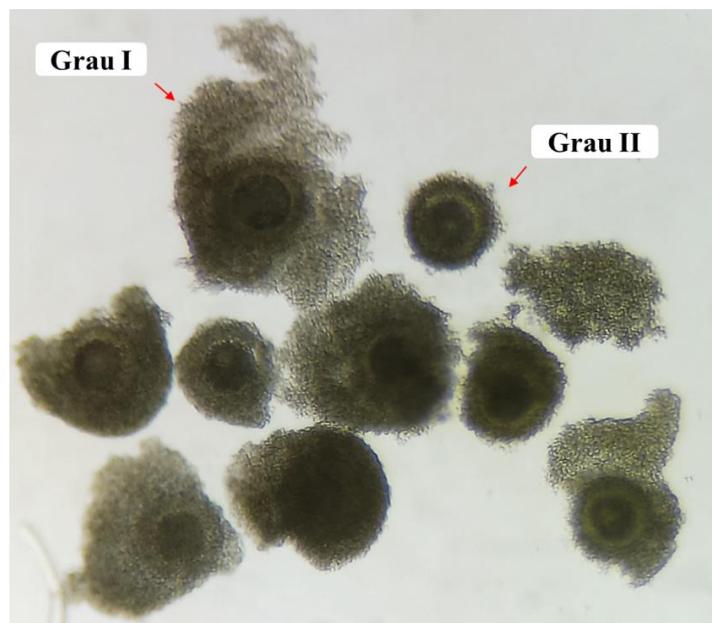


Figura 4. Oócitos bovinos imaturos (Grau I e II). **Fonte:** Arquivo pessoal, 2022.

902
903

2.3.2 Maturação *in vitro* (MIV)

Os CCO imaturos selecionados foram lavados em meio de MIV (FIVX Apoyar Biotech, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil) e distribuídos (no máximo 30 oócitos) para os tubos de poliestireno de fundo arredondado de 5mL, contendo o volume de 400 μ L de meio de MIV, recobertos por 200 μ L de óleo mineral (Figura 5), que foram mantidos em incubadora a 38°C, com 5,5 % de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade, sendo incubados por 22 horas.

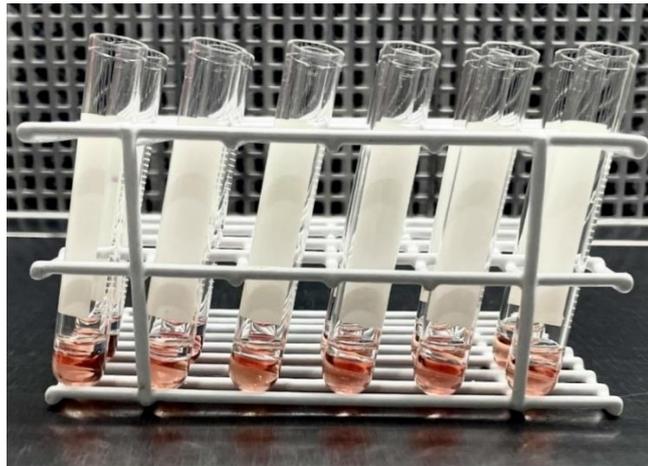


Figura 5. Tubo para maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos. **Fonte:** Acervo pessoal, 2023.

2.3.3 Fecundação *in vitro* (FIV)

Após 22 horas, as células do *cumulus* estavam visualmente expandidas (Figura 6). Os CCO foram retirados dos tubos e lavados em meio de FIV (FIVX Apoyar Biotech), e em seguida foram transferidos para gotas de 50 μ L de meio de FIV, em placas de Petri de 35x10mm, recobertas com óleo mineral. Para a fecundação, utilizou-se doses de sêmen de touros da raça *Aberdeen Angus*, obtidas de centrais especializadas.



Figura 6. Oócitos bovinos maturados. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2023.

923 Foram utilizados gradientes com densidades de 40% e 80%, preparados com Pure Sperm
924 (Nidacon®, Flöjelbergsgatan, Mölndal, SE) e meio de FIV, no qual os espermatozoides móveis
925 foram obtidos por centrifugação do sêmen descongelado, por duas vezes, a 5.000 rpm, sendo a
926 primeira centrifugação por cinco minutos e a segunda por três minutos. Por fim, os CCO
927 maturados e os espermatozoides foram co-incubados por 18 a 22 horas, nas mesmas condições
928 de ar atmosférico, temperatura e umidade da MIV.

929

930 2.3.4 Cultivo *in vitro* (CIV)

931 Para o início do cultivo, que é considerado o primeiro dia (D1) de desenvolvimento
932 embrionário após a fecundação, os presumíveis zigotos foram submetidos à agitação mecânica,
933 por pipetagem, por alguns segundos e também a subseqüentes lavagens, para a remoção das
934 células do *cumulus* e quaisquer sujidades presentes.

935 Em seguida foram conduzidos para suas respectivas gotas, contendo 60µL de meio de
936 CIV (FIVX Apoyar Biotech), em placas de Petri de 35x10mm, recobertas com óleo mineral
937 (Figura 7), respeitando cada tratamento. O meio de CIV de referência (utilizado como controle
938 negativo e como base para os demais meios suplementados) era constituído de SOF
939 suplementado com 5µL/mL de antibiótico, 3mg/mL de BSA livre de ácido graxo (A6003, 100g,
940 Sigma-Aldrich®) e 3µL/mL de antioxidante. No controle positivo, foi acrescentado 30µL/mL
941 (3%) de SFB (12657-029, 500mL, Gibco® by Thermo Fisher Scientific, Waltham,
942 Massachusetts, EUA).

943

944
945

Figura 7. Placa de cultivo *in vitro* (CIV) de embriões bovinos. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2023.

946 Os embriões dos ensaios preliminares foram cultivados em alta tensão de oxigênio (21%
947 de O₂). Em função dos resultados obtidos, os embriões do experimento foram cultivados em
948 baixa tensão de oxigênio (5,5%), ambos em incubadora a 38°C, com 5,5% de CO₂ em ar
949 atmosférico e 95% de umidade.

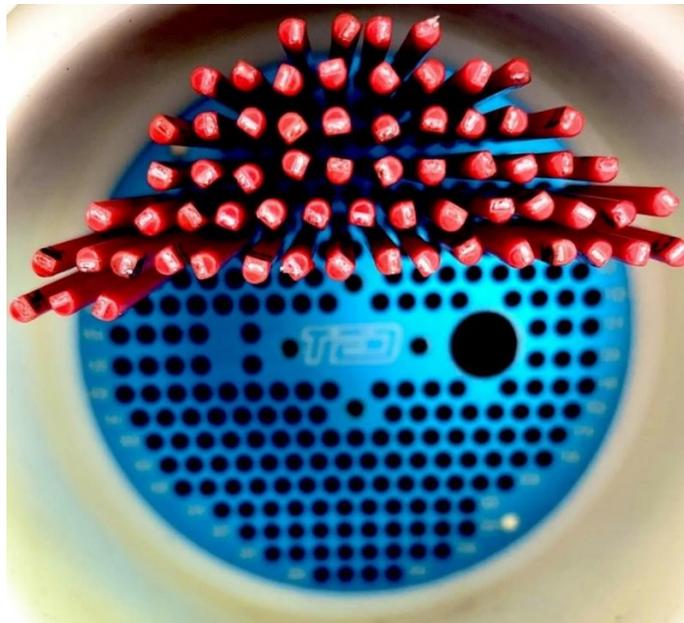
950 No terceiro dia de desenvolvimento (D3), foi realizado o primeiro *feeding*, que consiste
951 na troca de 75% do meio de CIV, e as estruturas clivadas foram contabilizadas. No sexto dia de
952 desenvolvimento embrionário (D6), foi realizado novamente o *feeding* e o momento em que os
953 blastocistos desenvolvidos até este dia foram contabilizados.

954

955 2.3.5 Envase e transferência de embriões

956 No D7, uma amostra dos blastocistos expandidos de qualidade excelente ou boa,
957 conforme classificação de Stringfellow & Seidel (1998), foram selecionados, envasados em meio
958 de transferência embrionária (MTE, FIVX Apoyar Biotech) e posicionados no centro de uma
959 palheta de 0,25mL para a transferência à fresco. A coluna central contendo o embrião é separada
960 por duas colunas de ar em cada lado. Cada palheta recebe um lacre identificado com um número
961 (Figura 8).

962



963
964
965

Figura 8. Palhetas contendo os embriões bovinos, lacradas e identificadas. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2023.

966 O deslocamento dos embriões até a propriedade, na qual as receptoras sincronizadas
967 foram inovuladas, ocorreu com o auxílio de um transportador, com cavidades para o alojamento
968 das palhetas de forma individual, favorecendo o seu aquecimento (38°C) de forma homogênea.
969 A transferência dos embriões foi realizada exclusivamente por um médico veterinário
970 capacitado que, primeiramente, verificou se a fêmea tinha potencial para ser receptora, baseado

971 na presença do CL. As transferências seguiram os procedimentos adotados comercialmente,
972 utilizando-se o método não cirúrgico.

973

974 2.3.6 Criopreservação de embriões

975 O método de criopreservação definido para avaliação dos embriões, no presente estudo,
976 foi a vitrificação, pois não requer o uso de um aparelho de congelamento (abastecido com
977 nitrogênio líquido), tornando a metodologia simples, rápida e barata. Utilizou-se os meios e o
978 protocolo estabelecido pela empresa FIVX Apoyar Biotech, em 2017.

979 O procedimento de vitrificação foi realizado no laboratório (previamente higienizado),
980 com os meios de vitrificação em temperatura ambiente. Primeiramente, uma amostra dos
981 embriões (com qualidade excelente) foi selecionada e os embriões lavados em duas gotas de
982 100 μ L de meio de lavagem e diluição, seguido por lavagem em uma gota de 200 μ L de meio de
983 vitrificação 1 (MV1) por 1 minuto, em rotação horária, seguido por mais 2 minutos em repouso,
984 na mesma gota.

985 Por fim, os embriões passaram por uma gota de 50 μ L de meio de vitrificação 2 (MV2)
986 e foram levados até a haste – metade de uma palheta 0,25, com corte em forma de bisel (Figura
987 9), após 30 segundos, foram submergidos em nitrogênio líquido. Uma vez vitrificados, os
988 embriões ficaram em nitrogênio líquido até o momento da desvitrificação (e reidratação).

989



990

991

992

Figura 9. Haste para vitrificação. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2023.

993

993 2.3.7 Prova de eclosão de embriões em laboratório

994 Para realização da prova de eclosão em laboratório, os embriões foram avaliados no D9
995 de CIV (48 horas após o D7), para registro da taxa de eclosão. Os embriões à fresco
996 permaneceram na mesma placa de CIV até as 72 horas. Para a prova de eclosão dos embriões
997 criopreservados pelo método de vitrificação, foram desvitrificados (reidratados) através do
998 protocolo estabelecido pela empresa FIVX Apoyar Biotech (2017).

999

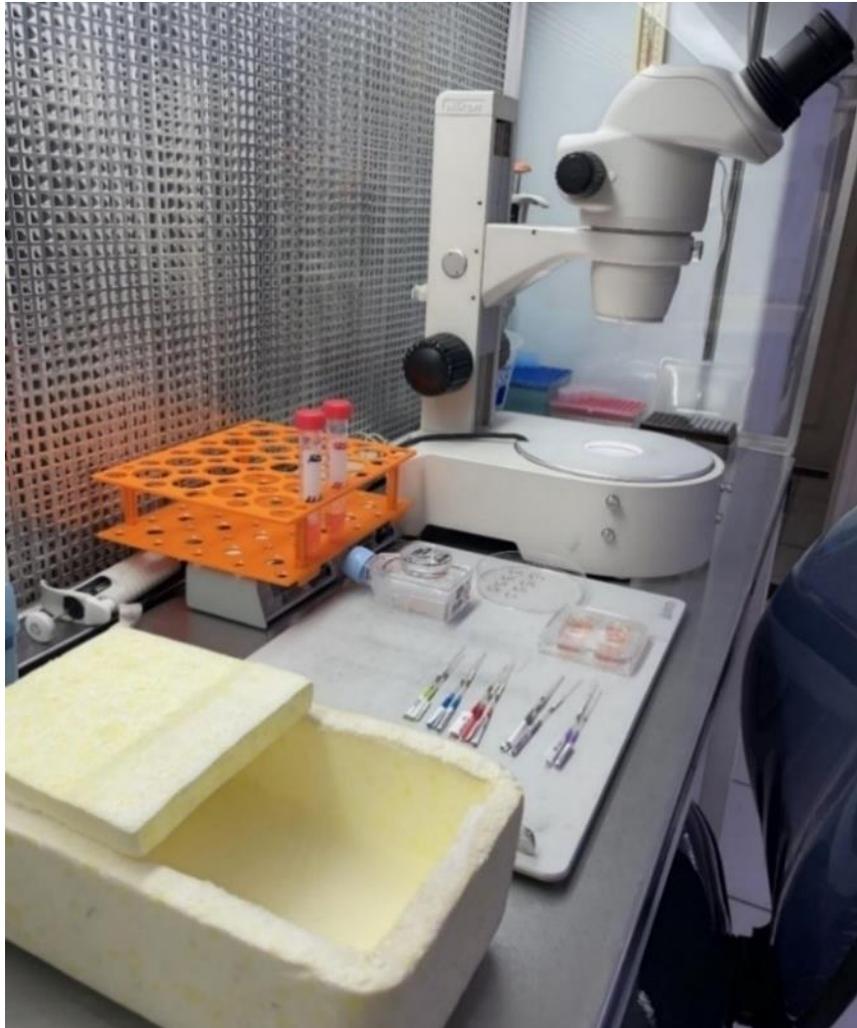
1000

1001

Conforme o protocolo da empresa, a haste que armazenava os embriões foi mergulhada em solução de desvitrificação 1 (SD1) por um minuto e na solução de desvitrificação 2 (SD2) por cinco minutos, em seguida os embriões foram lavados em quatro gotas de 100 μ L de meio

1002 de CIV (Figura 10), para a retirada do excesso dos crioprotetores e açúcares, e em seguida
1003 colocados novamente em cultivo onde permaneceram por 48 horas em placas de cultivo.

1004



1005
1006
1007

Figura 10. Estação de trabalho para desvitrificação (reidratação). **Fonte:** Arquivo pessoal, 2023.

1008

2.3.8 Análise de atividade mitocondrial

1009

1010

1011

1012

1013

1014

A análise da atividade mitocondrial foi realizada conforme metodologia descrita por Cañón-Beltrán et al. (2020), adaptada pelo grupo responsável pela análise, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília, DF, Brasil. Embriões em estágio de blastocisto expandido (BX), com qualidade excelente, durante o D7, foram lavados três vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS), suplementado com 0,3% de álcool polivinílico (PVA) (Figura 11).



Figura 11. Placa para lavagem dos blastocistos expandidos em PBS e PVA. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2022.

1015
1016
1017

1018 Após a lavagem dos embriões, estes foram alocados em meio de cultivo suplementado
1019 com 400nM de MitoTracker DeepRed (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), por 30 minutos,
1020 à 38,5°C. Ao término deste período, os embriões foram novamente lavados em PBS com 0,3%
1021 de PVA e fixados em paraformaldeído 4%, por uma hora; em seguida, foram armazenados no
1022 Laboratório de PIVE (Norte Embryo) a 4°C em paraformaldeído a 1%, por até uma semana,
1023 foram posteriormente encaminhadas para a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em
1024 Brasília, para avaliação.

1025 Após esse período de lavagem, coloração, fixação, armazenamento e transporte para a
1026 avaliação da atividade mitocondrial, os embriões foram colocados, individualmente, em placas
1027 de 35mm, em gotas de 4µL em solução anti-fade (SlowFade™; Molecular Probes, Eugene,
1028 OR, EUA), e avaliados em microscópio confocal (LSM Leica Sp8; New Orleans, LA, EUA)
1029 (Figura 12). As imagens foram submetidas as mesmas condições microscópicas de dissecção a
1030 laser, analisadas e foto documentadas pela objetiva 20x sob o Laser Argon 638, em um espectro
1031 de fluorescência entre 625 a 665 nanômetros.

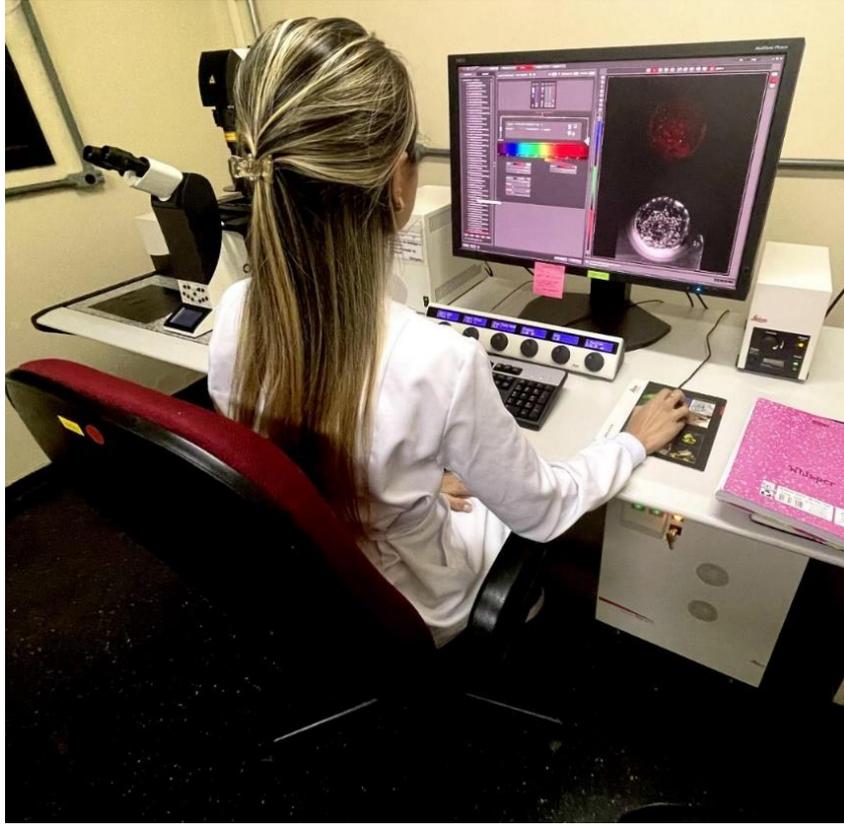


Figura 12. Realização de imagens com microscópio confocal. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2022.

1032
1033
1034

1035 Os embriões foram submetidos, um a um, a 30 cortes transversais, com intervalo de 2,96
1036 μm . Uma imagem foi criada com todas as seções sobrepostas. Após a criação da imagem final
1037 de cada embrião, elas foram analisadas no programa “ImageJ”. A quantificação foi realizada
1038 levando em consideração sua área e densidade integrada (IntDen), que corresponde à
1039 intensidade dos pixels detectados (cor vermelha) na imagem.

1040

1041 2.3.9 Análise do acúmulo de gotas lipídicas

1042 Para a análise do acúmulo de gotas lipídicas, conforme metodologia estabelecida por
1043 Faria et al. (2021), utilizou-se os mesmos embriões lavados, corados com MitoTracker
1044 DeepRed, fixados, armazenados e transportados para a Embrapa Recursos Genéticos e
1045 Biotecnologia em Brasília, DF, para avaliação.

1046 Após esse período, os embriões foram lavados duas vezes em PBS suplementado com
1047 0,3% de polivinilpirrolidona (PVP), incubados por 30 minutos em PBS suplementado com 0,2%
1048 de Triton e posteriormente, foram lavados três vezes em PBS com 0,3% de PVP e, em seguida,
1049 corados com Bodipy 493/503 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA; 20 $\mu\text{g/ml}$, diluído em 50 μL
1050 de etanol absoluto e 950 μL de PBS) (Figura 13), por uma hora.



Figura 13. Incubação em Triton e coloração com Bodipy. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2022.

1051
1052
1053

1054 Posteriormente, foram lavados três vezes em PBS com 0,3% de PVP, colocados
1055 individualmente em placas de 35x10mm em gotas de 4 μ L em solução anti-fade (SlowFade;
1056 Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) e avaliados em microscópio confocal de varredura. Todas
1057 as imagens foram submetidas as mesmas condições microscópicas de dissecação a laser (LSM
1058 Leica Sp8; New Orleans, LA, EUA).

1059 Todas as amostras foram analisadas e foto-documentadas, utilizando-se objetiva 20x
1060 sob o Laser Argon 488, para visualização das gotas lipídicas, em um espectro de fluorescência
1061 entre 495 a 505 nanômetros. Os embriões foram submetidos, um a um, a 30 cortes transversais,
1062 com intervalo de 2,96 μ m. Uma imagem foi criada com todas as seções sobrepostas, onde a
1063 presença das gotas lipídicas fluorescentes (cor verde) foram identificadas.

1064 Após a criação da imagem final de cada embrião, elas foram ajustadas em escala de cinza
1065 pelo software “ImageJ” e o fundo corrigido. A quantificação dos lipídios foi baseada na razão
1066 da área total do embrião.

1067

1068 2.3.10 Análise do número total de células embrionárias

1069 Os mesmos embriões (selecionados conforme a similaridade no tamanho da expansão
1070 da blastocela) corados com MitoTracker DeepRed e Bodipy 493/593 foram lavados em gotas
1071 de PBS com 0,3% de PVP e, em seguida, foram corados com o Hoechst 33342 (10mg/ml), por
1072 15 minutos. Após este período, foram novamente lavados e colocados entre uma lâmina e uma
1073 lamínula de vidro e observados em microscópio de epifluorescência (Axioplan 2, Zeiss®, Jena,
1074 Turíngia, Alemanha) (Figura 14).



Figura 14. Microscópio de epifluorescência (Axioplan 2, Zeiss®). **Fonte:** Lucas de Faria, 2023.

1075
1076

1077

1078 Os filtros de onda de excitação de 350nm, com emissão de fluorescência em 461nm,
1079 foi utilizado. O número total de células (cor azul) foi contabilizado.

1080

1081 **2.4 Análise estatística**

1082 Com o objetivo de avaliar o efeito dos grupos e réplicas, os dados expressos em médias
1083 e porcentagens foram assumidos como variáveis quantitativas contínuas e foram testadas
1084 quanto ao padrão de distribuição e submetidas à ANOVA usando os procedimentos Glimmix
1085 do SAS (SAS Studio 3.8, Edição Universitária; SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Na
1086 ausência de efeito de réplica, e para os demais dados percentuais, as diferenças foram
1087 comparadas utilizando-se o método do Qui-quadrado.

1088 As diferenças entre as médias foram comparadas com o teste de Tukey. Um valor P de <
1089 0,05 foram considerados significativos. Os resultados são apresentados como média ± EPM.

1090 **3. RESULTADOS**

1091 **3.1 Ensaios preliminares**

1092 Ensaio 1: Substituição do BSA e SFB por YE 100 %

1093 Os resultados obtidos no primeiro ensaio mostram (Tabela 3) uma menor taxa de
1094 clivagem (44,2% vs. 71,7%) e ausência do desenvolvimento embrionário em D6 (0%) e em D7
1095 (0%), quando os zigotos foram cultivados em meio sem BSA e SFB, apenas acrescido de
1096 10mg/mL de YE (G1: YE 100%, sem BSA e SFB).

1097

Tabela 3. Ensaio 1: Substituição do BSA e SFB por YE 100 % – Clivagem (D3) e blastocistos (D6 e D7).

GRUPO*	CCO (N)	CIV (N)	D3 (N)	D3 (%)	D6 (N)	D6 (%)	D7 (N)	D7 (%)
G1: YE 100%, sem BSA e SFB	450	425	188	44,2 ^a	0	0,0	0	0,0
G2: CP	840	792	568	71,7 ^b	165	20,8	284	35,9

1098 **G1:** SOF acrescido de YE (10mg/mL - 100%), sem BSA e SFB; **G2:** SOF acrescido de BSA (3mg/mL) e SFB
1099 (30µL/mL - 3%). *Três réplicas foram utilizadas para casa tratamento. Resultados para D3, D6 e D7 em %. a, b:
1100 P<0,0001 (Qui-quadrado).

1101

1102 Ensaio 2: Substituição do SFB por YE 100 %, com BSA

1103 De forma similar ao primeiro ensaio, observou-se (Tabela 4) menor taxa de clivagem
1104 (37,8% vs. 73,7%) e ausência de desenvolvimento embrionário em D6 (0%) e em D7 (0%),
1105 quando os zigotos foram cultivados em meio sem SFB, acrescido de 10mg/mL de YE e 3mg/mL
1106 de BSA (G1: YE 100%).

1107

Tabela 4. Ensaio 2: Substituição do SFB por YE 100 %, com BSA – Clivagem (D3) e blastocistos (D6 e D7).

GRUPO*	CCO (N)	CIV (N)	D3 (N)	D3 (%)	D6 (N)	D6 (%)	D7 (N)	D7 (%)
G1: YE 100%	400	386	146	37,8 ^a	0	0,0	0	0,0
G2: CP	870	855	630	73,7 ^b	183	21,4	360	42,1

1108 **G1:** SOF acrescido de YE (10mg/mL – 100%) e BSA (3mg/mL), sem SFB; **G2:** SOF acrescido de BSA (3mg/mL)
1109 e SFB (30µL/mL – 3%). *Três réplicas foram utilizadas para cada tratamento. Resultados para D3, D6 e D7 em
1110 %. a, b: P<0,0001 (Qui-quadrado).

1111

1112 Ensaio 3: Curva dose-resposta (YE 100, 75, 50, 25, 10 e 1%), com BSA

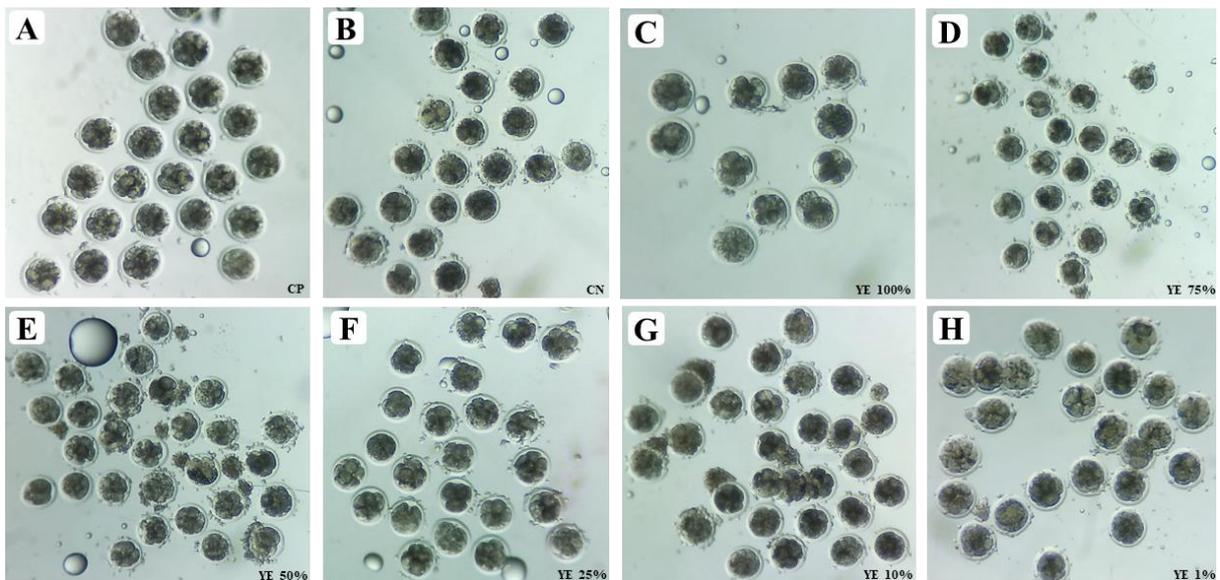
1113 Observou-se (Tabela 5) que concentrações de YE iguais ou inferiores a 25% resultavam
1114 em taxas de clivagem semelhantes às obtidas no controle positivo, com SFB (G1).

Tabela 5. Ensaio 3: Curva dose-resposta, com BSA – Clivagem (D3) e blastocistos (D6 e D7).

GRUPO*	CCO (N)	CIV (N)	D3 (N)	D3 (%)	D6 (N)	D6 (%)	D7 (N)	D7 (%)
G1: CP	95	93	68	73,1 ^{ab}	28	30,1	43	46,2 ^a
G2: CN	66	60	42	70,0 ^{ab}	2	3,3	4	6,7 ^b
G3: YE 100%	96	78	29	37,2 ^c	0	0,0	0	0,0 ^c
G4: YE 75%	96	86	54	62,8 ^b	0	0,0	0	0,0 ^c
G5: YE 50%	96	88	55	62,5 ^b	0	0,0	0	0,0 ^c
G6: YE 25%	96	93	72	77,4 ^a	0	0,0	0	0,0 ^c
G7: YE 10%	96	91	63	69,2 ^{ab}	0	0,0	1	1,1 ^{bc}
G8: YE 1%	96	91	74	81,3 ^a	0	0,0	4	4,4 ^b

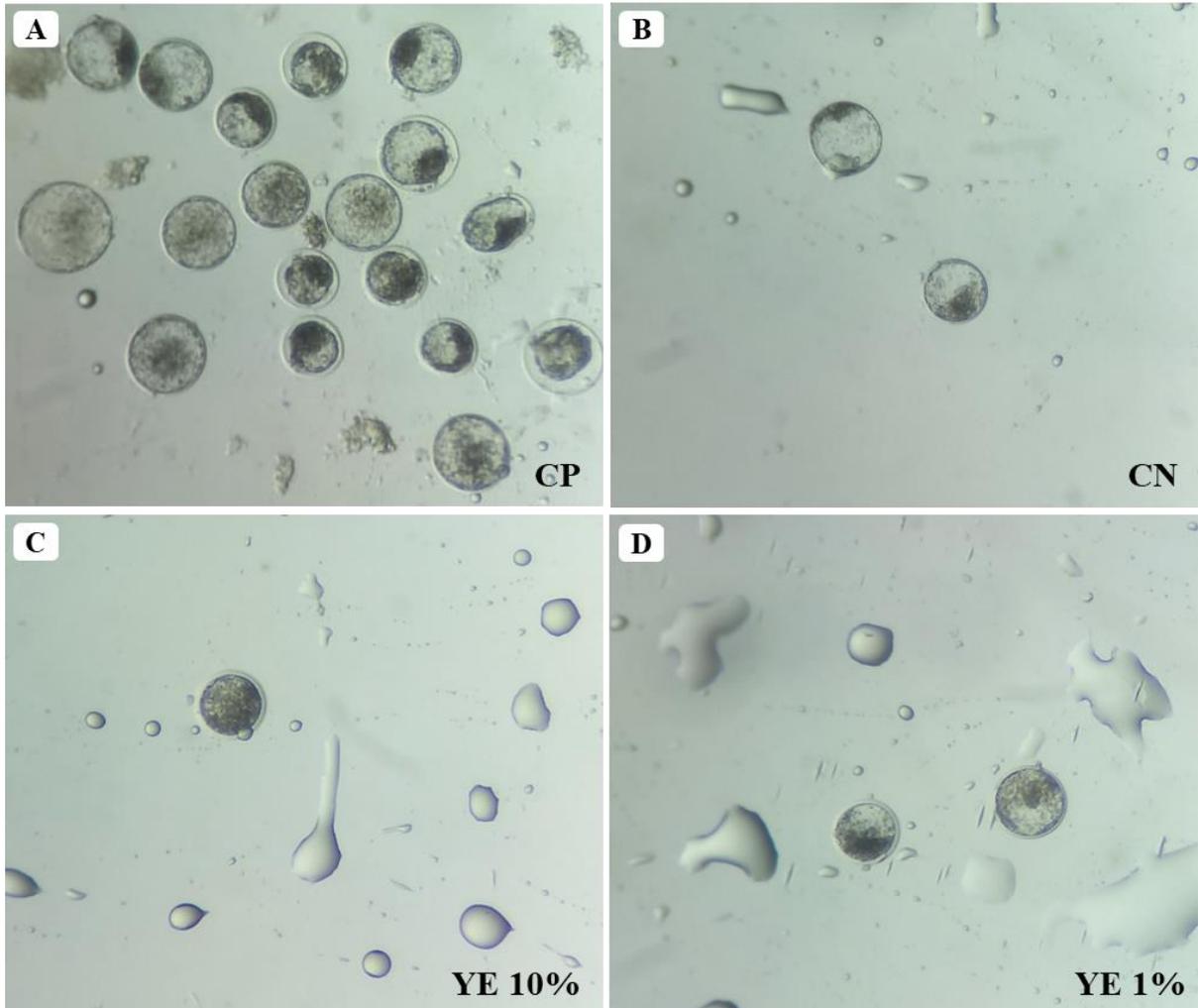
1115 SOF acrescido de BSA (3mg/mL) e: **G1:** SFB (30µL/mL – 3%); **G2:** sem suplementação; **G3:** YE (10mg/mL -
 1116 100%); **G4:** YE (7,5mg/mL - 75%); **G5:** YE (5,0mg/mL - 50%); **G6:** YE (2,5mg/mL - 25%); **G7:** YE (1mg/mL -
 1117 10%); **G8:** YE (0,1mg/mL - 1%). *Duas réplicas foram utilizadas para cada tratamento. a, b, c: P<0,05 (Qui-
 1118 quadrado ou Teste Exato de Fisher).
 1119

1120 A avaliação qualitativa (subjetiva) também sugere que concentração menores (25, 10 e
 1121 1%) de YE apresentaram padrão de clivagem similar ao controle positivo (G1) (Figura 15).
 1122



1123 **Figura 15 (A-H).** Imagens da clivagem no terceiro dia de CIV, no ensaio 3. Os embriões foram cultivados em SOF
 1124 acrescido de BSA (3mg/mL) e: **A:** SFB (30µL/mL – 3%); **B:** sem suplementação; **C:** YE (10mg/mL - 100%); **D:**
 1125 YE (7,5mg/mL - 75%); **E:** YE (5,0mg/mL - 50%); **F:** YE (2,5mg/mL - 25%); **G:** YE (1mg/mL - 10%); **H:** YE
 1126 (0,1mg/mL - 1%).
 1127
 1128

1129 A avaliação dos blastocistos ocorreu nos D6 e D7. Os resultados mostram que a
 1130 concentração de YE de 1% apresentou taxa de blastocisto semelhante à do CIV apenas com
 1131 BSA (CN), e superior aos cultivos com YE em concentrações acima de 10%, porém inferiores
 1132 ao do grupo suplementado com SFB (G1), conforme ilustrado na Figura 16.



1133
1134 **Figura 16 (A-D).** Imagens dos blastocistos no sétimo dia de CIV, no ensaio 3. Os embriões foram cultivados em
1135 SOF acrescido de BSA (3mg/mL) e: **A:** SFB (30 μ L/mL – 3%); **B:** sem suplementação; **C:** YE (1mg/mL – 10%);
1136 **D:** YE (0,1mg/mL – 1%).

1137 1138 **3.2 Experimento: Uso do YE no CIV**

1139 A Tabela 6 apresenta os resultados da PIVE com as diferentes estratégias de
1140 suplementação no CIV testadas. Não foram observadas diferenças nas taxas de clivagem entre
1141 os grupos (81,9% \pm 1,1a; 76,1% \pm 1,3a; 84,1% \pm 1,0a; 82,4% \pm 0,8a e 80,9% \pm 0,8a para G1, G2, G3,
1142 G4 e G5, respectivamente; $P=0,6424$). O grupo que recebeu YE até o D3 e SFB até D9 (G4:
1143 47,4% \pm 0,8a) apresentou taxa de blastocisto semelhante ($P>0,05$) ao grupo suplementado com
1144 SFB do início ao fim do CIV (G1: 43,6% \pm 0,9ab), porém maiores ($P=0,0016$) que nos grupos
1145 nos quais o CIV ocorreu sem SFB (G2: 29,8% \pm 0,7b; G3: 32,8% \pm 0,6b e G5: 30,0% \pm 0,9b).

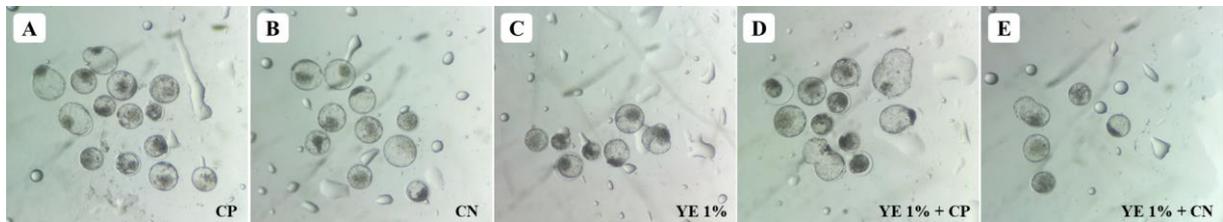
1146 As taxas de eclosão no grupo suplementado com SFB durante todo o CIV (G1:
1147 74,0% \pm 0,8a), suplementados com YE 1% durante todo o CIV (G3: 61,8% \pm 0,7ab),
1148 suplementado com YE 1% até o D3 e com (G4: 76,0% \pm 0,8a) ou sem (G5: 70,0% \pm 0,8a) SFB
1149 até o D9 foram semelhantes ($P>0,05$). Os grupos G1, G4 e G5 obtiveram taxas maiores
1150 ($P=0,0001$) em relação ao obtido no grupo sem suplementação (G2: 48,2% \pm 0,5b).

Tabela 6. Experimento: Uso do YE no CIV – Clivagem (D3), blastocistos (D6 e D7) e eclosão (D9).

GRUPO*	CCO (N)	CIV (N)	D3 (N)	D3 (%)	D6 (N)	D6 (%)	D7 (N)	D7 (%)	D9 (N)	D9 (%)
G1: CP	297	282	231	81,9±1,1 ^a	92	33,6±0,6 ^a	123	43,6±0,9 ^{ab}	91	74,0±0,8 ^a
G2: CN	297	285	217	76,1±1,3 ^a	40	14,0±0,4 ^b	85	29,8±0,7 ^b	41	48,2±0,5 ^b
G3: YE 1%	288	271	228	84,1±1,0 ^a	27	10,0±0,3 ^b	89	32,8±0,6 ^b	55	61,8±0,7 ^{ab}
G4: YE 1% + CP	288	272	224	82,4±0,8 ^a	89	32,7±0,7 ^a	129	47,4±0,8 ^a	98	76,0±0,8 ^a
G5: YE 1% + CN	288	267	216	80,9±0,8 ^a	27	10,1±0,7 ^b	80	30,0±0,9 ^b	56	70,0±0,8 ^a
Valor-P				0,6424		0,0001		0,0016		0,0001

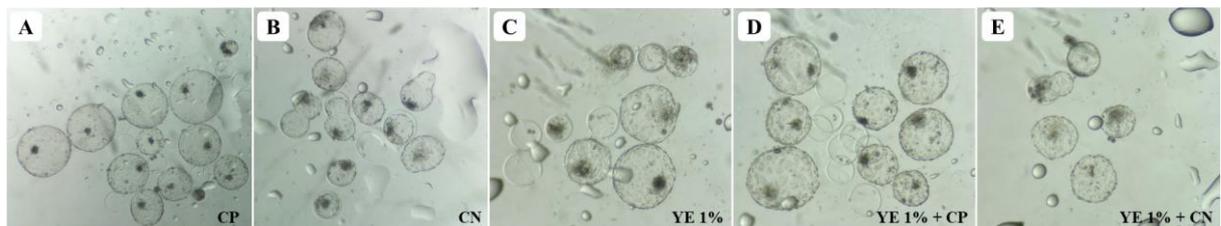
1151 SOF acrescido de BSA (3mg/mL) e: **G1:** 30µL/mL (3%) de SFB em todo o CIV; **G2:** sem suplementação em todo
 1152 o CIV; **G3:** 0,1mg/mL (1%) de YE em todo o CIV; **G4:** 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e 30µL/mL (3%) de SFB
 1153 até o D9; **G5:** 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e sem suplementação até o D9. *Nove réplicas foram utilizadas
 1154 para cada tratamento. Valores com diferentes letras sobscritas, na mesma coluna, diferem (P<0,05).
 1155

1156 A avaliação qualitativa subjetiva do desenvolvimento embrionário em D7 mostrou que,
 1157 independentemente da taxa de conversão dos presumíveis zigotos em blastocistos, todos os
 1158 grupos (G1, G2, G3, G4 e G5) apresentaram blastocistos com boa expansão de blastocele (BX)
 1159 e qualidade morfológica excelente, de acordo com a classificação de Stringfellow & Seidel
 1160 (1998). Imagens representativas dos blastocistos em D7 dos cinco grupos são mostrados na
 1161 Figura 17.
 1162



1163 **Figura 17 (A-E).** Imagens dos blastocistos no sétimo dia de CIV. Os embriões foram cultivados em SOF acrescido
 1164 de BSA (3mg/mL) e: **A:** 30µL/mL (3%) de SFB em todo o CIV; **B:** sem suplementação em todo o CIV; **C:**
 1165 0,1mg/mL (1%) de YE em todo o CIV; **D:** 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e 30µL/mL (3%) de SFB até o D9; **E:**
 1166 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e sem suplementação até o D9.
 1167
 1168

1169 A avaliação qualitativa subjetiva do desenvolvimento embrionário à fresco, em D9,
 1170 mostrou blastocistos eclodidos (BE), apresentando MCI compacta em um polo, dentro do
 1171 trofoblasto completo, conforme descrição de Vejlsted et al. (2006), para G1, G2, G3, G4 e G5,
 1172 ilustrados na Figura 18 (A-E), respectivamente.
 1173



1174 **Figura 18 (A-E).** Imagens dos blastocistos no nono dia de CIV. Os embriões foram cultivados em SOF acrescido
 1175 de BSA (3mg/mL) e: **A:** 30µL/mL (3%) de SFB em todo o CIV; **B:** sem suplementação em todo o CIV; **C:**
 1176 0,1mg/mL (1%) de YE em todo o CIV; **D:** 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e 30µL/mL (3%) de SFB até o D9; **E:**
 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e sem suplementação até o D9.

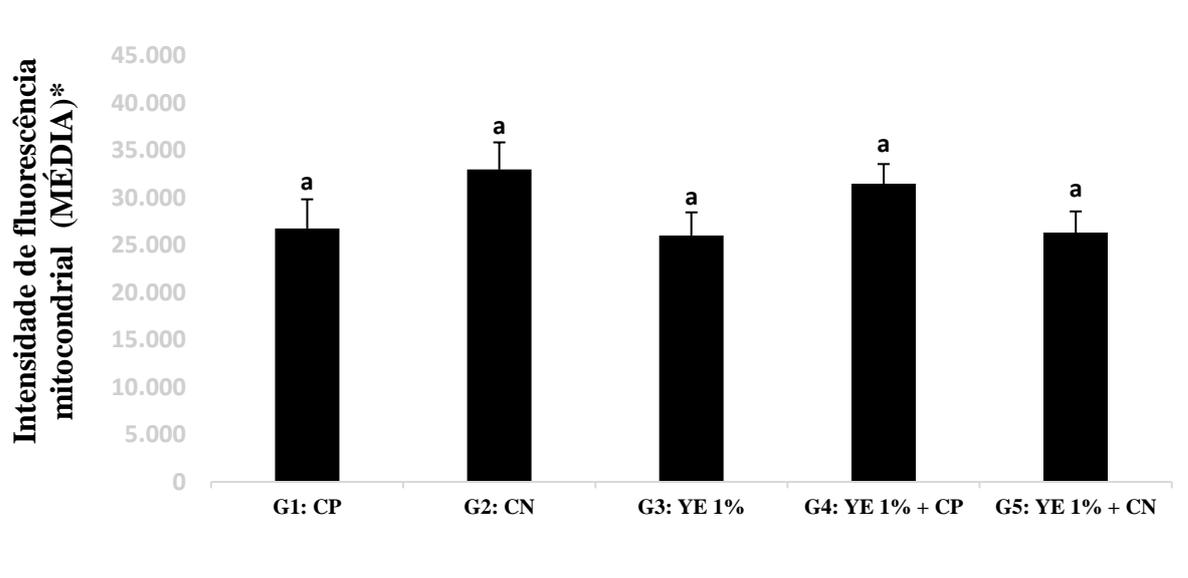
1177 0,1mg/mL (1%) de YE em todo o CIV; **D**: 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e 30µL/mL (3%) de SFB até o D9;
 1178 **G5**: 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e sem suplementação até o D9.

1179
 1180

1181 3.3 Análises qualitativas

1182 3.3.1 Atividade Mitocondrial

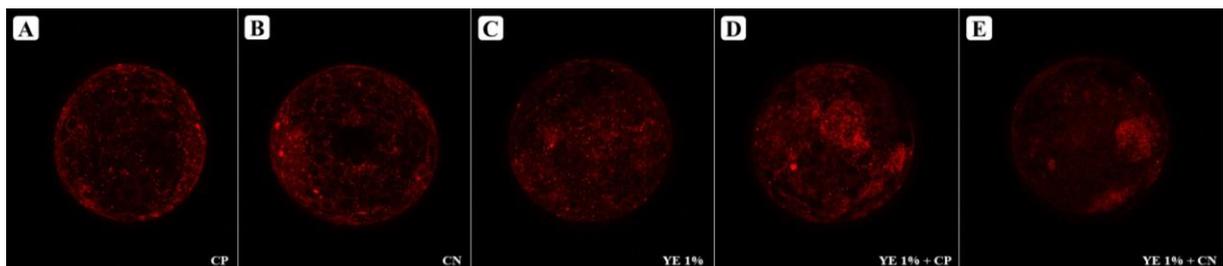
1183 Não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos para atividade mitocondrial
 1184 (26.759 ± 3.08 ; 32.982 ± 2.870 ; 26.019 ± 2.442 ; 31.388 ± 2.172 e 26.225 ± 2.336 ; para G1 (n=19),
 1185 G2 (n=19), G3 (n=18), G4 (n=19) e G5 (n=17), respectivamente; $P=0,1907$), estimada com
 1186 base na quantificação da intensidade do sinal de fluorescência (Figura 19).



1187 **Figura 19.** Intensidade de fluorescência mitocondrial (IFM) em embriões no sétimo dia de CIV. Os embriões
 1188 foram cultivados em SOF acrescido de BSA (3mg/mL) e: **G1**: 30µL/mL (3%) de SFB em todo o CIV; **G2**: sem
 1189 suplementação em todo o CIV; **G3**: 0,1mg/mL (1%) de YE em todo o CIV; **G4**: 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3
 1190 e 30µL/mL (3%) de SFB até o D9; **G5**: 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e sem suplementação até o D9. *Quatro
 1191 réplicas foram utilizadas para cada tratamento. Resultados para IFM foram apresentados como média \pm EPM. a:
 1192 Valores com letras iguais sobrescritas não diferem ($P>0,05$).
 1193
 1194

1195 Imagens representativas dos blastocistos durante o D7, corados com MitoTracker
 1196 DeepRed, dos cinco grupos, com intensidade de fluorescência mitocondrial semelhantes, estão
 1197 demonstradas na Figura 20 (A-E).

1198



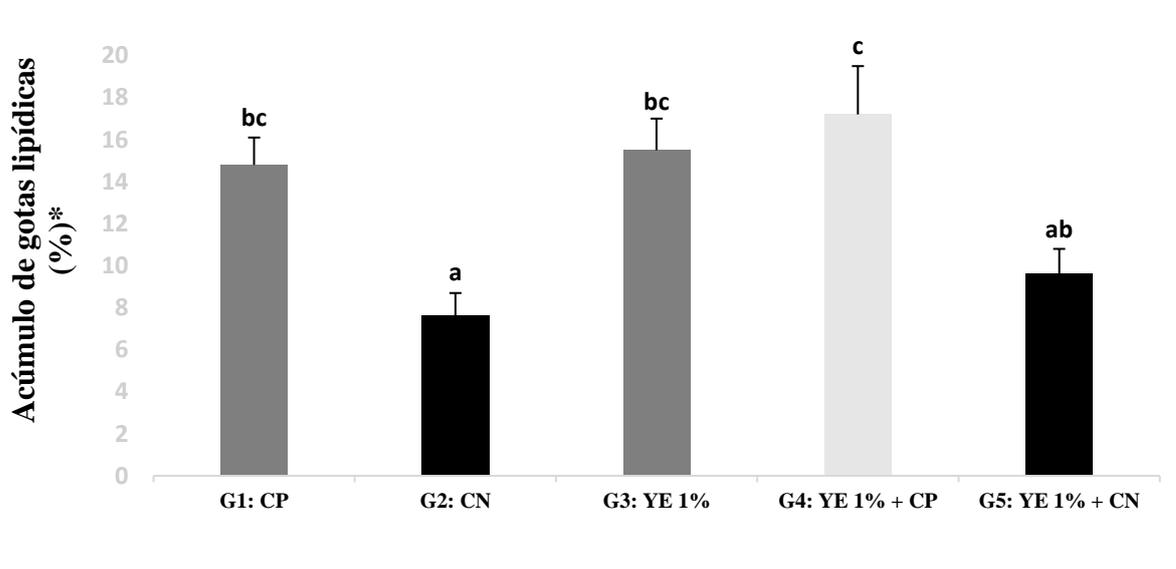
1199 **Figura 20 (A-E).** Imagens dos blastocistos no sétimo dia de CIV, corados com MitoTracker DeepRed, observados
 1200 em microscópio confocal. Os embriões foram cultivados em SOF acrescido de BSA (3mg/mL) e: **A**: 30µL/mL
 1201 (3%) de SFB em todo o CIV; **B**: sem suplementação em todo o CIV; **C**: 0,1mg/mL (1%) de YE em todo o CIV;
 1202 **D**: 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e 30µL/mL (3%) de SFB até o D9; **E**: 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e sem
 1203

1204 suplementação até o D9.

1205

1206 3.3.2 Acúmulo de gotas lipídicas

1207 Os resultados da avaliação do acúmulo de gotas lipídicas estão demonstrados na Figura
 1208 21. Embriões cultivados sem suplementação com SFB ou YE (G2; n=20; 7,6%±1,1a)
 1209 apresentaram menor (P=0,0001) acúmulo de gotículas lipídicas do que aqueles suplementados
 1210 com SFB durante todo o CIV (G1; n=19; 14,8%±1,3bc) ou após o *feeding* com SFB no D3 e
 1211 D6 de CIV (G4; n=19; 17,2%±2,3c), mas também do que no grupo que recebeu apenas YE (G3;
 1212 n=17; 15,5%±1,5bc). Contudo, o G2 não diferiu do grupo no qual o YE 1% é suplementando
 1213 apenas até o D3 (G5; n=17, 9,6%±1,2ab).

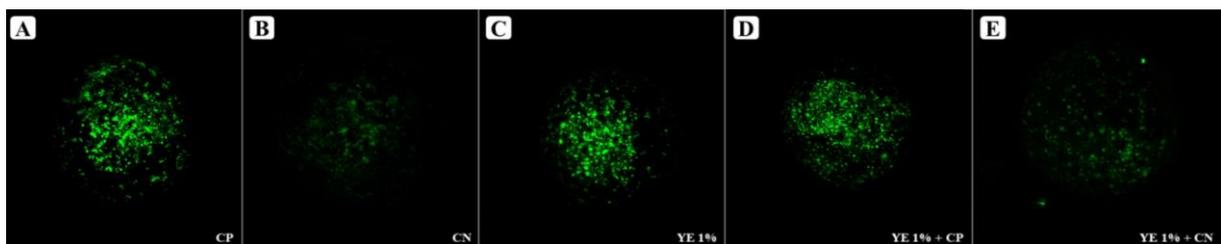


1214

1215 **Figura 21.** Acúmulo de gotas lipídicas em embriões no sétimo dia de CIV. Os embriões foram cultivados em SOF
 1216 acrescido de BSA (3mg/mL) e: **G1:** 30µL/mL (3%) de SFB em todo o CIV; **G2:** sem suplementação em todo o
 1217 CIV; **G3:** 0,1mg/mL (1%) de YE em todo o CIV; **G4:** 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e 30µL/mL (3%) de SFB
 1218 até o D9; **G5:** 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e sem suplementação até o D9. *Quatro réplicas foram utilizadas
 1219 para cada tratamento. Os resultados são a porcentagem ± EPM. a, b, c: Valores com diferentes letras sobrescritas
 1220 diferem (P<0,05).
 1221

1222 Imagens representativas dos blastocistos durante o D7, corados com Bodipy, mostram
 1223 menor (G2, Figura 22B; e G5, Figura 22E) e maior (G1, G3 e G4, Figuras 22A, C e D) conteúdo
 1224 lipídico.

1225



1226

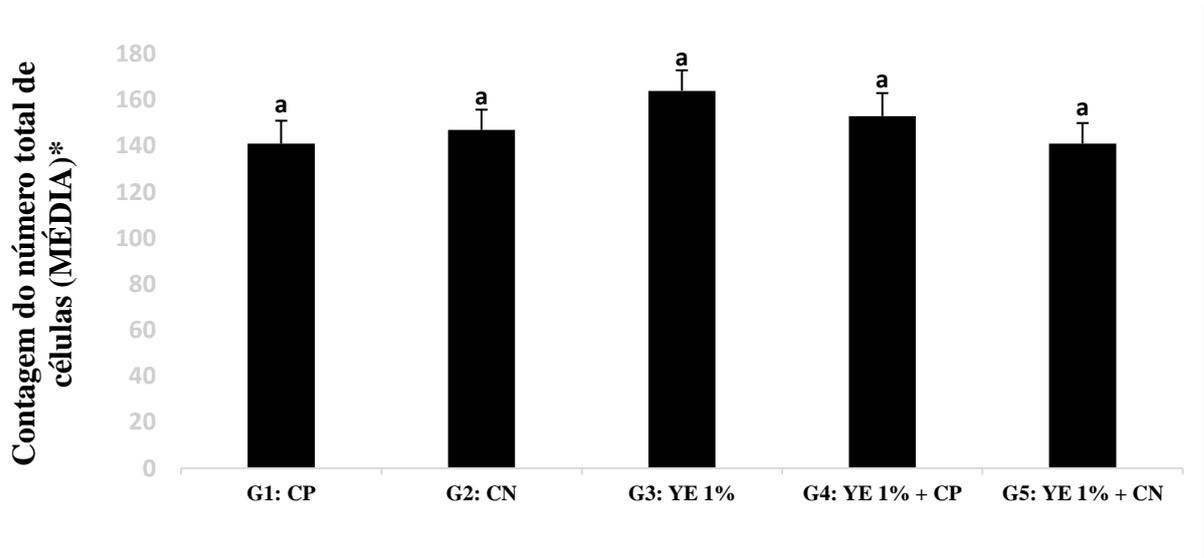
1227 **Figura 22 (A-E).** Imagens dos blastocistos no sétimo dia de CIV, corados com Bodipy, observados em
 1228 microscópio confocal. Os embriões foram cultivados em SOF acrescido de BSA (3mg/mL) e: **A:** 30µL/mL (3%)
 1229 de SFB em todo o CIV; **B:** sem suplementação em todo o CIV; **C:** 0,1mg/mL (1%) de YE em todo o CIV; **D:**
 1230 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e 30µL/mL (3%) de SFB até o D9; **E:** 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e sem

1231 suplementação até o D9.

1232

1233 3.3.3 Contagem do número total de células embrionárias

1234 Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) no número total de células embrionárias entre
 1235 os grupos ($141\pm 10,0$; $147\pm 8,8$; $164\pm 8,9$; $153\pm 10,0$ e $141\pm 9,0$, para G1 (n=17), G2 (n=18), G3
 1236 (n=16), G4 (n=15) e G5 (n=18), respectivamente; $P=0,3969$) (Figura 23).



1237

1238

1239

1240

1241

1242

1243

1244

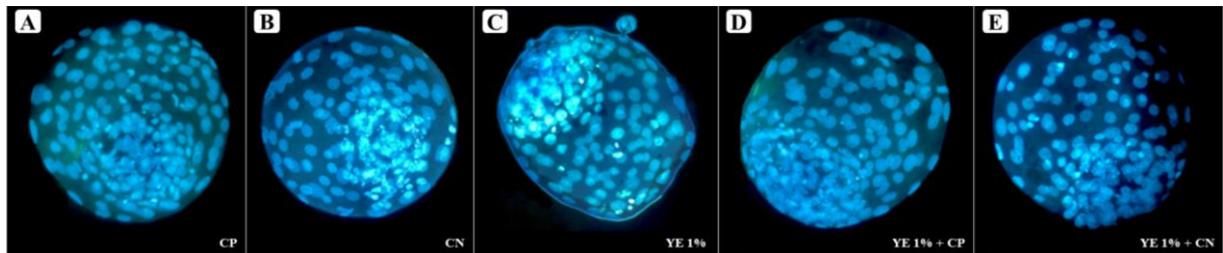
Figura 23. Contagem do número total de células em embriões no sétimo dia de CIV. Os embriões foram cultivados em SOF acrescido de BSA (3mg/mL) e: **G1:** 30 μ L/mL (3%) de SFB em todo o CIV; **G2:** sem suplementação em todo o CIV; **G3:** 0,1mg/mL (1%) de YE em todo o CIV; **G4:** 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e 30 μ L/mL (3%) de SFB até o D9; **G5:** 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e sem suplementação até o D9. *Quatro réplicas foram utilizadas para cada tratamento. Os resultados são a média \pm EPM. a: Valores com letras iguais sobrescritas não diferem ($P>0,05$).

1245

1246

1247

Imagens representativas dos blastocistos durante o D7, corados com Hoechst 33342, dos
 cinco grupos, com número total de células semelhantes, são mostradas na Figura 24.



1248

1249

1250

1251

1252

1253

1254

1255

Figura 24 (A-E). Imagens dos blastocistos no sétimo dia de CIV, corados com Hoechst 33342, observados em microscópio de epifluorescência. Os embriões foram cultivados em SOF acrescido de BSA (3mg/mL) e: **A:** 30 μ L/mL (3%) de SFB em todo o CIV; **B:** sem suplementação em todo o CIV; **C:** 0,1mg/mL (1%) de YE em todo o CIV; **D:** 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e 30 μ L/mL (3%) de SFB até o D9; **E:** 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e sem suplementação até o D9.

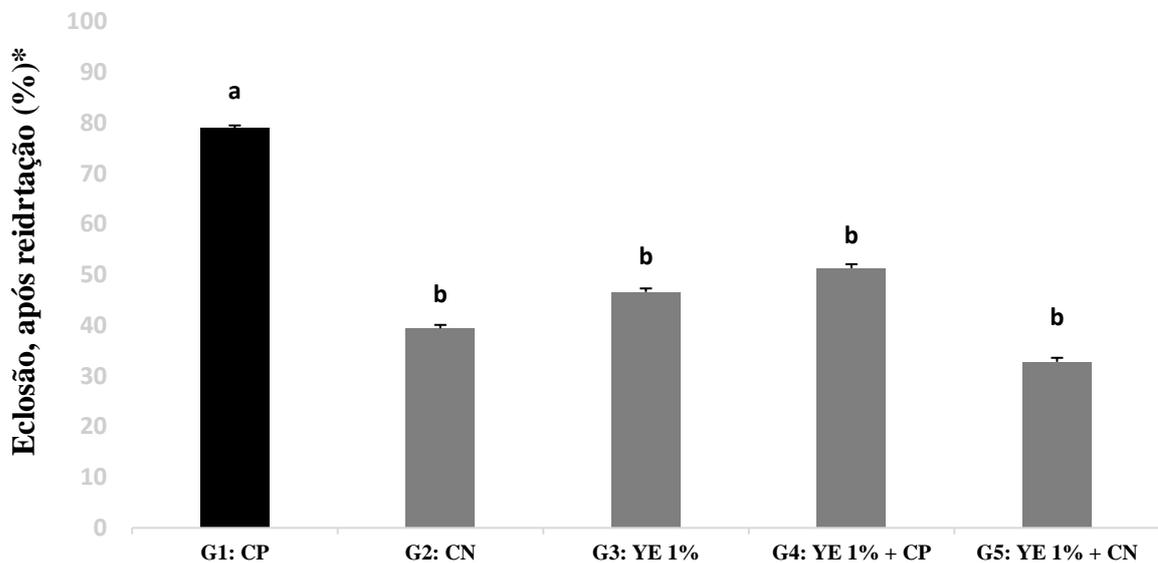
1255 3.3.4. Vitrificação

1256

1257

Os resultados obtidos mostram (Figura 25) maiores taxas de eclosão após a vitrificação,
 seguido por reidratação dos blastocistos, quando o SFB foi usado ao longo de todo CIV

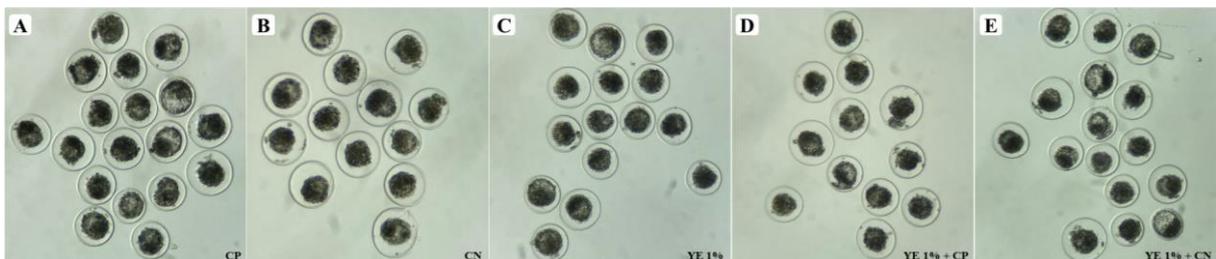
1258 (78,9%±6,0 vs. 39,4%±7,0; 46,6%±7,0; 51,3%±8,0 e 32,8%±8,0, para G1 (76/70) vs. G2
1259 (71/28), G3 (73/34), G4 (76/39) e G5 (64/21), respectivamente; P=0,0001).



1260
1261 **Figura 25.** Taxa de eclosão no nono dia de CIV, após desvitrificação (reidratação). Os embriões foram cultivados
1262 em SOF acrescido de BSA (3mg/mL) e: **G1:** 30µL/mL (3%) de SFB em todo o CIV; **G2:** sem suplementação em
1263 todo o CIV; **G3:** 0,1mg/mL (1%) de YE em todo o CIV; **G4:** 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e 30µL/mL (3%)
1264 de SFB até o D9; **G5:** 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e sem suplementação até o D9. *Nove réplicas foram
1265 utilizadas para cada tratamento. Resultados para embriões vitrificados/desvitrificados foram apresentados em
1266 porcentagem ± EPM. a, b: Valores com diferentes letras sobrescritas diferem (P<0,05).
1267

1268 Imagens representativas dos blastocistos em contração osmótica, após reidratação em
1269 D7, dos cinco grupos, são mostrados na Figura 26 (A-E).

1270



1271
1272 **Figura 26 (A-E).** Imagens dos blastocistos no sétimo dia de CIV, após desvitrificação (reidratação). Os embriões
1273 foram cultivados em SOF acrescido de BSA (3mg/mL) e: **A:** 30µL/mL (3%) de SFB em todo o CIV; **B:** sem
1274 suplementação em todo o CIV; **C:** 0,1mg/mL (1%) de YE em todo o CIV; **D:** 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e
1275 30µL/mL (3%) de SFB até o D9; **E:** 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e sem suplementação até o D9.
1276

1277 A avaliação qualitativa subjetiva do desenvolvimento embrionário após reidratação, em
1278 D9, mostrou blastocistos fora da ZP (BE), apresentando MCI compacta em um polo, dentro do
1279 trofoblasto completo, conforme descrição de Vejlsted et al. (2006), para o G1 e G4,
1280 suplementados com SFB (Figuras 27A e 27D).

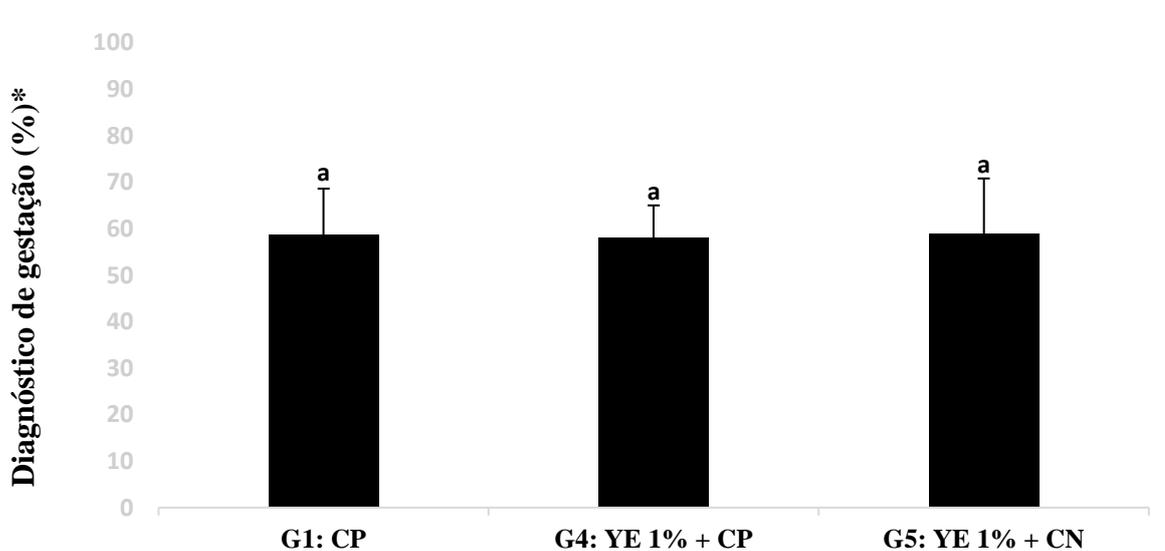
1281 No G3 nota-se blastocistos degenerados (Figura 27C); e no G2 e G5 nota-se (Figuras
 1282 27B e 27E), blastocistos eclodidos, em maioria, de qualidade regular, apresentando maior
 1283 número de alterações morfológicas ou extrusões celulares.
 1284



1285 **Figura 27 (A-E).** Imagens dos blastocistos no nono dia de CIV, após desvitrificação (reidratação). Os embriões
 1286 foram cultivados em SOF acrescido de BSA (3mg/mL) e: **A:** 30 μ L/mL (3%) de SFB em todo o CIV; **B:** sem
 1287 suplementação em todo o CIV; **C:** 0,1mg/mL (1%) de YE em todo o CIV; **D:** 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e
 1288 30 μ L/mL (3%) de SFB até o D9; **E:** 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e sem suplementação até o D9.
 1289
 1290

1291 3.3.5 Taxa de gestação

1292 Com base nos resultados anteriores, três grupos foram selecionados para TE: G1
 1293 (29/17); G4 (50/29) e G5 (17/10). Não houve diferença nas taxas de gestação subsequentes
 1294 (58,6 \pm 10,0; 58,0 \pm 7,0 e 58,8 \pm 12,0, respectivamente; P=0,9738), conforme demonstrado na
 1295 Figura 28.



1296 **Figura 28.** Diagnóstico de gestação aos 28 dias. Os embriões foram cultivados em SOF acrescido de BSA
 1297 (3mg/mL) e: **G1:** 30 μ L/mL (3%) de SFB em todo o CIV; **G4:** 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e 30 μ L/mL (3%)
 1298 de SFB até o D9; **G5:** 0,1mg/mL (1%) de YE até o D3 e sem suplementação até o D9. *Uma réplica foi utilizada
 1299 para cada tratamento. Resultados para prenhez foram apresentados em porcentagem \pm EPM. a: Valores com letras
 1300 iguais sobrescritas não diferem (P>0,05).
 1301

1302 4. DISCUSSÃO

1303 O SFB é largamente utilizado em sistemas de PIVE comerciais. Diversos estudos,
1304 contudo, vêm evidenciando problemas associados ao uso do SFB, como distúrbios no
1305 metabolismo e no padrão de expressão gênica embrionários, com conseqüentes alterações
1306 fenotípicas relacionadas, por exemplo, segundo Crocco et al. (2013), à menor criotolerância.

1307 Desta forma, torna-se necessária a busca por alternativas para substituir ou reduzir o uso
1308 do SFB. A hipótese central do presente estudo é se SFB poderia ser totalmente ou parcialmente
1309 substituído por YE, uma nova fonte de macromoléculas, durante o cultivo *in vitro* de embriões
1310 bovinos. Como não foram encontrados registros anteriores do uso de YE em sistemas de PIVE
1311 na literatura, foi necessário a realização de ensaios preliminares para avaliar a toxicidade
1312 potencial e a concentração a ser eventualmente utilizada.

1313 Os resultados dos ensaios preliminares demonstraram que concentrações de YE
1314 superiores a 25% (2,5mg/mL) comprometeram o desenvolvimento embrionário, com
1315 paralisação do metabolismo logo nas primeiras divisões mitóticas, conforme observado nas
1316 taxas de clivagem. De fato, a morfologia dos embriões observada após as primeiras clivagens
1317 é um marcador de qualidade embrionária muito utilizado na reprodução assistida em humanos
1318 (FENWICK, et al., 2002; LEMMEN, et al., 2008).

1319 Em bovinos, diversos autores (LONERGAN, et al., 1999; LONERGAN, et al., 2000;
1320 LUNDIN et al., 2001; FENWICK, et al., 2002; VAN MONTFOORT et al., 2004)
1321 demonstraram que zigotos que clivam precocemente, entre 28 a 32 horas após a fecundação
1322 são mais propensos a atingir o estágio de blastocisto e possuem melhor qualidade, caracterizada
1323 por menor grau de fragmentação, menor taxa de blastômeros irregulares, maior contagem de
1324 blastômeros, menor índice de células mortas, bem como maior sobrevivência após a
1325 criopreservação. Além disso, mostram uma incidência reduzida de aberrações cromossômicas
1326 (MUNNE & COHEN, 1998; MAGLI et al., 2007) e um nível mais alto de transcrições de genes
1327 importantes para o desenvolvimento (GUTIERREZ-ADAN et al., 2004).

1328 Contudo, o baixo resultado do grupo controle negativo (apenas com BSA) e do grupo
1329 com concentração de YE a 1% (0,1mg/mL), no ensaio preliminar 3, em alta tensão de oxigênio
1330 (21% de O₂), levou a adoção de baixa tensão de oxigênio (5,5% de O₂) nos cultivos
1331 subsequentes, pois de fato, o uso dessa maior tensão de oxigênio resultou em uma conversão
1332 de blastocistos em D7 similar a relatada na literatura (LONERGAN et al., 1999). Acredita-se
1333 que a sobrecarga oxidativa afete a taxa de blastocistos, devido ao elevado percentual de morte
1334 celular (YOON et al., 2014). Além dos bovinos (LONERGAN et al., 1999), a redução da

1335 concentração de oxigênio durante o CIV melhorou a taxa de blastocistos de camundongos
1336 (UMAOKA et al., 1992).

1337 Adicionalmente, a suplementação do meio de CIV com YE 1% em baixa tensão de
1338 oxigênio nas demais réplicas, não comprometeu nenhum dos indicadores quantitativos de
1339 produção, quando comparados aos grupos controle. Todos os grupos suplementados com YE
1340 1%, sob baixa tensão de oxigênio, foram capazes de produzir blastocistos de qualidade
1341 morfológica excelente e com boa expansão de blastocele (BX), que é um indicativo de
1342 qualidade e associado a maiores taxas de prenhez (FARIN et al., 2004).

1343 Os potenciais efeitos benéficos da adição de macromoléculas nas taxas de clivagem,
1344 produção e eclosão à fresco, dependem do período do CIV em que a suplementação proteica é
1345 usada. Desta forma, no presente estudo avaliou não apenas o efeito da substituição total SFB
1346 por YE (G3), mas também do seu uso em um sistema sequencial (parcial), através do *feeding*,
1347 uma eventual troca da suplementação (G4 e G5), buscando suprir as necessidades fisiológicas
1348 dos embriões em seus diferentes estágios do desenvolvimento.

1349 Os resultados obtidos confirmaram a hipótese, uma vez que é possível a substituição
1350 total do SFB por YE 1% durante todo os CIV (G3) e a substituição parcial do SFB por YE 1%,
1351 até o D3 (G4 e G5) sem prejuízo nas taxas de blastocisto no D7. Maiores taxas de blastocistos
1352 são esperadas em cultivos suplementados com SFB, quando comparados aos que utilizam
1353 apenas BSA como fonte de macromoléculas (LEIVAS et al. 2011), conforme observado
1354 também no presente estudo.

1355 Adicionalmente, as taxas de eclosão à fresco e de gestação obtidas com o uso do YE em
1356 sistema sequencial com (G4) e mesmo sem SFB (G5) resultaram em taxas eclosão e de prenhez
1357 aos 28 dias de gestação, respectivamente, semelhante às obtidas com o sistema padrão do
1358 laboratório, que usa 3% de SFB em todo os CIV (G1). Os resultados mostram que, YE 1%
1359 adicionado ao CIV, não causa diferença na intensidade de fluorescência mitocondrial ou no
1360 número total de células embrionárias, quando comparados com embriões produzidos com SFB
1361 ou sem suplementação, sugerindo que a atividade mitocondrial foi preservada e não houve
1362 prejuízo ao crescimento embrionário, respectivamente. A contagem do número total de células
1363 em embriões produzidos *in vitro* tem sido utilizada como indicador da qualidade embrionária,
1364 por proporcionarem maiores chances de sucesso gestacional (CAIXETA et al., 2017;
1365 GUIMARÃES et al., 2015; CORRÊA et al. 2008; PEREIRA et al., 2005).

1366 Contudo, embriões cultivados na ausência de SFB podem apresentar menor acúmulo de
1367 gotas lipídicas, conforme observado nos resultados do grupo controle negativo (G2) e do
1368 suplementado com YE 1% até o D3 sem SFB (G5) do presente estudo. Por outro lado,

1369 curiosamente, o uso do YE 1% em todo o CIV (G3) resultou em um acúmulo de lipídios
1370 semelhante ao observado no controle positivo (G1). Os resultados dos grupos com meio
1371 sequencial sugerem ainda um possível efeito aditivo do acúmulo de lipídios decorrente do YE
1372 e do SFB (G3). Esse resultado evidencia um efeito do YE, independente do uso de BSA no
1373 meio base utilizado em todos os cultivos. Contudo trata-se de um efeito indesejável, na
1374 perspectiva da busca de um potencial substituto total para o SFB.

1375 Curiosamente e contradizendo os resultados de Rizos et al. (2003), a ausência de
1376 suplementação com SFB, mesmo resultando em menor acúmulo de conteúdo lipídico
1377 citoplasmático, foi associada à redução na criotolerância dos embriões, conforme evidenciado
1378 pela taxa de eclosão dos blastocistos após a vitrificação-reidratação. De fato, maiores taxas de
1379 eclosão após vitrificação-reidratação foram obtidas quando o SFB foi usado durante todo o
1380 CIV, sugerindo que a criotolerância é afetada por outros fatores além do acúmulo de lipídios,
1381 por exemplo, insuficiência de nutrientes ou erro na transcrição de genes importantes. Segundo
1382 VAJTA et al. (1999), é necessária a suplementação sérica para eclosão de blastocistos
1383 reidratados.

1384 Em resumo, o sistema de cultivo sequencial, YE 1% até D3 sem SFB (G5), ou seja, sem
1385 suplementação sérica no CIV, não causou prejuízo nas taxas de blastocistos, eclosão à fresco
1386 ou de prenhez, reduziu o acúmulo de lipídio citoplasmático; contudo, ainda que esse não tenha
1387 sido um fator determinante, também reduziu a criotolerância dos embriões. Essas informações
1388 podem fornecer indicações para futuros estudos visando o uso do YE na PIVE em bovinos.

1389 **5. CONCLUSÃO**

- 1390 • O YE pode ser utilizado como suplemento em meios de CIV de embriões bovinos, associado
1391 a BSA (3mg/mL), desde que em concentrações inferiores a 10% (1mg/mL). Em outras
1392 condições, o YE apresentou toxicidade para os embriões, comprometendo seu
1393 desenvolvimento;
- 1394
- 1395 • O uso do YE como suplemento, na ausência de SFB, resulta em taxas semelhantes às obtidas
1396 apenas com BSA, porém o YE causa maior acúmulo de lipídios no citoplasma;
- 1397
- 1398 • Não há evidências de que a substituição parcial do SFB por YE 1% comprometa o
1399 desenvolvimento embrionário ou as taxas de gestação pós-transferência à fresco.

1400 **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

1401 Baseado nos resultados quantitativos e qualitativos obtidos nesta dissertação, a
1402 suplementação com YE 1% em sistema de cultivo sequencial não comprometeu o
1403 desenvolvimento embrionário, as taxas de eclosão à fresco ou as taxas de gestação pós-
1404 transferência.

1405 Porém, seu potencial uso como fonte proteica alternativa para o SFB, durante o cultivo
1406 *in vitro* em bovinos deve considerar o acúmulo lipídico citoplasmático, reduzindo as vantagens
1407 desta fonte de macromoléculas.

1408 **7. APOIO FINANCEIRO**

1409 Este trabalho foi contemplado pelo Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP) do

1410 Departamento de Pós-Graduação (DPG), edital 0002/2022, 0001/2022 e 0010/2023.

1411

1412 **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1413

1414 CAIXETA, F. M. C.; SOUSA, R. V.; GUIMARÃES, A. L.; LEME, L. O.; SPRÍ- CIGO, J. F.
1415 W.; NETTO, S. S.; PIVATO, I.; DODE, M. A. N. Meiotic arrest as an alternative to increase
1416 the production of bovine embryos by somatic cell nuclear transfer. **Zygote**, v. 25, n. 1, p. 32-
1417 40, 2017.

1418

1419 CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; RAMOS, A. A.;
1420 FILHO, V. R. V. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction**, v.3,
1421 n.1, p.19-28, 2006.

1422

1423 CAÑÓN-BELTRÁN, K.; GIRALDO-GIRALDO, J.; CAJAS, Y. N.; BELTRÁN-BREÑA, P.;
1424 HIDALGO, C. O.; VÁSQUEZ, N.; LEAL, C. L. V.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; GONZÁLEZ,
1425 E. M.; RIZOS, D. Inhibiting diacylglycerol acyltransferase-1 reduces lipid biosynthesis in
1426 bovine blastocysts produced *in vitro*. **Theriogenology**, v.158:p.267-276, 2020.

1427

1428 CHEN, Z.; HAGEN, D. E.; ELSIK, C. G; JI, T.; MORRIS, C. J.; MOON, L. E.; RIVERA, R.
1429 M. Characterization of global loss of imprinting in fetal overgrowth syndrome induced by
1430 assisted reproduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**
1431 **of America**, v. 112 (15), p.4618-4623, 2015.

1432

1433 CHUN, B. H.; KIM, J. H.; LEE, H. J.; CHUNG, N. Usabilidade de frações excluídas de
1434 tamanho de hidrolisados de proteína de soja para crescimento e viabilidade de células de ovário
1435 de hamster chinês em cultura de suspensão livre de proteína. **Técologia Bioresour.** v.98,
1436 p.1000-005, 2007.

1437

1438 CROCCO M. C.; KELMANSKY D. M.; MARIANO M. I. Does serum cause lipid-droplet
1439 accumulation in bovine embryos produced *in vitro*, during developmental days 1 to 4?. **J Assist**
1440 **Reprod Genet.** v.30 (10): p.1377-1388, 2013.

1441

1442 CORRÊA, G. A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T. C. D.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N.
1443 Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: effect in production and expression
1444 of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 2-4, p. 132-142,
1445 2008.

1446

1447 FARIA, O. A. C.; KAWAMOTO, T. S.; DIAS, L. R. O.; FIDELIS, A. A. G.; LEME. L. O.;
1448 CAIXETA, F. M. C.; GOMES, A. C. M. M.; SPRÍCIGO, J. F. W.; DODE, M. A. N. Maturation
1449 system affects lipid accumulation in bovine oocytes. **Reprod Fertil**, 33 (5), p.372-380, 2021.

1450

1451 FARIN, C. E.; FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A. Development of fetuses from *in vitro* -
1452 produced and cloned bovine embryos. **Journal of Animal Science**, v.82, p.53-62, 2004.

1453

1454 FENWICK, J.; PLATTEAU, P.; MURDOCH, A. P.; HERBERT, M. O tempo desde a
1455 inseminação até a primeira clivagem prediz a assim como foi observado após competência de
1456 desenvolvimento de embriões humanos pré-implantação *in vitro*. **Hum Reprod**, 17 (2),p.407-
1457 412, 2002.

1458

1459 GARDNER, D. K.; LANE, M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible
1460 proposition for human IVF? **Human reproduction update**, v.3, n.4, p.367382, 1997.

1461

1462 GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos.** 2ª ed. London: CABI Publishing,
p.548, 2003.

- 1463
1464 GUIMARÃES, A. L. S.; PEREIRA, S. A.; LEME, L. O.; DODE, M. A. N. Evaluation of the
1465 simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine *in vitro* embryo
1466 production. **Theriogenology**, v. 83, n. 1, p. 52-57, 2015.
- 1467
1468 GUTIERREZ-ADAN, A.; RIZOS, D.; FAIR, T.; MOREIRA, P. N.; PINTADO, B.; DE LA
1469 FUENTE, J.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Efeito da velocidade de desenvolvimento no
1470 padrão de expressão de mRNA em embriões bovinos precoces cultivados *in vivo ou in vitro*.
1471 **Mol Reprod Dev**. v.68, p.441-448, 2004.
- 1472
1473 KIM, S. H.; LEE, G. M. Desenvolvimento de meio isento de soro suplementado com
1474 hidrolisados para a produção de anticorpos terapêuticos em culturas de células CHO utilizando
1475 planejamento de experimentos. **Appl Microbiol Biotechnol**. v.83, p.639-648, 2009.
- 1476
1477 LEE, D. Y.; LEE, S. Y.; YUN, S. H.; JEONG, J. W.; KIM, J. H.; KIM, H. W.; CHOI, J. S.;
1478 KIM, G. D.; JOO, S. T.; CHOI, I.; HUR, S. J. Review of the Current Research on Fetal Bovine
1479 Serum and the Development of Cultured Meat. **Food science of animal resources**. v.42, n.5,
1480 p.775-799, 2022.
- 1481
1482 LEIVAS, F. G.; BRUM, D. S.; FIALHO, S. S.; SALIBA, W. P.; ALVIM, M. T.; BERNARDI,
1483 M. L.; RUBIN, M. I.; SILVA, C. A. Fetal calf serum enhances *in vitro* production of Bos taurus
1484 indicus embryos. **Theriogenology**. v.75, n.3, p.429-433, 2011.
- 1485
1486 LEMMEN, J. G.; AGERHOLM, I.; ZIEBE, S. Marcadores cinéticos da qualidade do embrião
1487 humano usando gravações de lapso de tempo de oócitos fertilizados por FIV/ICSI. **Reprod**
1488 **Biomed Online**, 7 (3), p.385-39, 2008.
- 1489
1490 LONERGAN, P.; KHATIR, H.; PIUMI, F.; RIEGER, D.; HUMBLOT, P.; BOLAND, M. P.
1491 Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics,
1492 Sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **Journal Reproduction and**
1493 **Fertility**. v.117, p.159-167, 1999.
- 1494
1495 LONERGAN, P.; O'KEARNEY-FLYNN, M.; BOLAND, M. P. Effect of protein
1496 supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in
1497 synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. **Theriogenology**, v.51 (8),
1498 p.1565-1576, 1999.
- 1499
1500 LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; PINTADO, B.; FAIR, T.; WARD, F.; FUENTE,
1501 J. D.; BOLAND, M. Relação entre o tempo de primeira clivagem e a expressão do fator de
1502 crescimento IGF-I, seu receptor e dois genes housekeeping em embriões bicelulares bovinos e
1503 blastocistos produzidos *in vitro*. **Mol Reprod Dev**, v.57, p.146-152, 2000.
- 1504
1505 LUNDIN, K.; BERGH, C.; HARDARSON, T. A clivagem precoce do embrião é um forte
1506 indicador da qualidade do embrião na fertilização *in vitro* humana. **Hum Reprod**,
1507 16 (12), p. 2652-2657, 2001.
- 1508
1509 MAGLI, M. C.; GIANAROLI, L.; FERRARETTI, A. P.; LAPPI, A.; RUBERTI, A.;
1510 FARFALLI, V. A morfologia e o desenvolvimento do embrião dependem do complemento
1511 cromossômico. **Fert Steril**, v.87, p.534-541, 2007.
- 1512
1513 MOSSER, M.; KAPEL, R.; CHEVALOT, I.; OLMOS, E.; MARC, I.; MARC, A.; ORIOL, E.

- 1514 Fractionation of yeast extract by nanofiltration process to assess key compounds involved in
1515 CHO cell culture improvement. **Biotechnology progress**. v.31, n.4, p.875-882, 2015.
1516
- 1517 MUNNE, S. & COHEN, J. Anormalidades cromossômicas em embriões humanos. **Hum**
1518 **Reprod Update**, v.4, p.842-855, 1998.
1519
- 1520 PEREIRA, D. C., DODE, M. A. N., & RUMPF, R. Evaluation of different culture systems on
1521 the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 63, n. 4, p.1131-1141, 2005.
1522
- 1523 SAGIRKAYA, H.; MISIRLIOGLU, M.; KAYA, A.; FIRST, N. L.; PARRISH, J. J.; MEMILI,
1524 E. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture
1525 conditions. **Animal reproduction science**, v.101 (3-4), p.225-240, 2007.
1526
- 1527 STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual da Sociedade Internacional de**
1528 **Transferência de Embriões**. p.112-113, 1998.
1529
- 1530 SUNG, Y. H.; LIM, S. W.; CHUNG, J. Y.; LEE, G. M. Hidrolisado de levedura como aditivo
1531 de baixo custo para meio isento de soro para a produção de trombopoietina humana em culturas
1532 em suspensão de células de ovário de hamster chinês. **Appl Microbiol Biotechnol**. v.63, p.527-
1533 536, 2004.
1534
- 1535 UMAOKA, Y.; NODA, Y.; NARIMOTO, K.; MORI, T. 1992. Effects of oxygen toxicity on
1536 early development of mouse embryos. **Mol Reprod Dev**. 31:28–33.
1537
- 1538 VAN MONTFOORT, A. P.; DUMOULIN, J. C.; KESTER, A. D.; EVERS J. L. A clivagem
1539 precoce é uma adição valiosa aos parâmetros de seleção de embriões existentes: um estudo
1540 usando transferências de embriões únicos. **Hum Reprod**, v.19, p.2103-2108, 2004.
1541
- 1542 VAN DER VALK J. Fetal bovine serum-a cell culture dilemma. **Science**. v.375, n.6577, p.143-
1543 144, 2022.
1544
- 1545 VIANA, J. H.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; FERNANDES, C. A. C.;
1546 MARQUES JÚNIOR, A. P. Short intervals between ultrasonographically guided follicle
1547 aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the
1548 Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, v.84, p.1-12, 2004.
1549
- 1550 YOON, S.; CHOI, S.A.; SIM, B.W.; KIM, J.S.; MUN, S.E.; JEONG, P.S.; YANG, H.J.; LEE,
1551 Y.; PARK, Y.H.; SONG, B.S.; KIM, Y.H.; JEONG, K.J.; HUH, J.W.; LEE, S.R.; KIM, S.U.;
1552 CHANG, K.T. 2014. Developmental competence of bovine early embryos depends on the
1553 coupled. **Biol Reprod**. 90:1-10.
1554
- 1555 ZHANG, P.; CAO, L.; MA, Y. Y.; SU, B.; ZHANG, C. Y.; LI, Y. P. Metagenomic analysis
1556 reveals presence of different animal viruses in commercial fetal bovine serum and
1557 trypsin. **Zoological research**, v.43 (5), p.756-766, 2022.

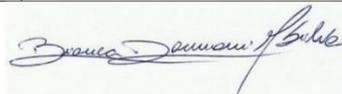
1558 9. ANEXOS

1559 9.1. Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética

	<p align="center">Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA/Cenargen)</p> 
<p align="center">CERTIFICADO</p> <p align="center">006/2022</p>	

Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos da adição de extrato de levedura no cultivo *in vitro* de embriões bovinos”, registrada com o número Protocolo CEUA Nº 006/2022, sob a responsabilidade de João Henrique Moreira Viana, que envolve manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA (CEUA/CENARGEN) em reunião ordinária realizada em 13 de dezembro de 2022.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15/12/2022 a 01/06/2023
Espécie/linhagem/raça	bovino
Nº de animais	150
Peso/Idade	200 a 400 kg / 2 a 5 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Fazendas privadas Alta Floresta - MT



Coordenação CEUA/Cenargen
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

1561 **9.2 Resumos submetidos à congressos**1562 **9.2.1 49th Annual Conference of the International Embryo Technology Society (IETS)**

1563

216 Effect of removing hormone and antioxidant supplementation during oocyte maturation in cattle: preliminary resultsL. A. G. Martinhão^{A,E}, L. P. Martins^A, D. N. Ribas^{D,E}, J. G. V. de Grázia^{B,E} and J. H. M. Viana^{A,C}^AUniversidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil^BFIVX Apoyar Biotech, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil^CEmbrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brasil^DUniversidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil^ENorte Embryo, Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil

Research focusing on the development of gamete and embryo culture systems was generally based on the supplementation of media used *in vitro*. Recently, however, questions have been raised about whether the excess of substances during embryo culture could have possible long-term consequences for animal health and disease. In this study, we evaluated the effect of removing hormones (FSH, LH, insulin, and oestradiol) and antioxidants (β -Mercaptoethanol) from the medium used for *in vitro* maturation of oocytes. Cumulus-oocyte complexes (COC) recovered from slaughterhouse ovaries (mostly from Nelore [*Bos taurus indicus*] cows) were transported in saline (38°C) to an *in vitro* embryo production (IVEP) laboratory (Norte Embryo) located at Alta Floresta, MT, Brazil. COC with more than three layers of cumulus cells and dark and homogeneous cytoplasm, morphologically classified as grade 1 ($n = 1,095$), were randomly allocated into three groups, which underwent *in vitro* maturation (IVM) in TCM199 as follows: G1, control group, supplemented with FSH, LH, insulin, oestradiol, and β -Mercaptoethanol ($n = 360$); G2, without hormone supplementation ($n = 360$); and G3, without hormone and antioxidant supplementation ($n = 375$). Cumulus cells' expansion was evaluated at 22 h of IVM and subjectively scored as good, fair, or poor. The COC from all groups were then *in vitro* fertilised with semen from Aberdeen Angus sires with known fertility and presumptive zygotes were *in vitro* cultured under the same medium and incubation conditions. Data were analysed using the Proc Glimmix or the Proc NPar of the SAS (SAS Institute). As expected, the lack of hormone supplementation resulted in lower COC expansion in G2 and G3, compared with G1 ($P < 0.0001$). However, no differences ($P > 0.05$) were observed among G1, G2, and G3 on cleavage rate (73.5 ± 1.2 , 73.7 ± 1.2 and 67.1 ± 1.3 , respectively), blastocyst rate at Day 6 (27.6 ± 0.5 , 23.6 ± 0.6 and 23.6 ± 0.7), blastocyst rate at Day 7 (37.9 ± 0.7 , 37.7 ± 1.0 and 32.6 ± 0.9), or on the percentage of hatched blastocysts at Day 10 (79.9 ± 0.7 , 77.1 ± 0.7 and 74.4 ± 0.8). Our preliminary data suggest that removal of hormone supplementation from IVM media, in the conditions used in the current experiment, does not significantly impact IVEP. However, potential impacts on embryo quality and developmental potential still need to be investigated.

1564

1565 9.2.2 XIV Semana da Biologia de Alta Floresta (SEBAF)

1566

Influência do corpo lúteo (CL) presente em ovários de doadoras gestantes e não-gestantes na produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos.

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica da reprodução e envolve o manejo das doadoras e receptoras, recuperação dos oócitos a partir da punção folicular, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV). Apesar dos grandes avanços na PIVE, a eficiência produtiva de embriões ainda é baixa, e existe fortes indícios de que este fato é relacionado com a qualidade dos oócitos imaturos recuperados. O corpo lúteo (CL) é uma glândula endócrina, que se forma no ovário após uma ovulação, capaz de sintetizar e secretar progesterona, hormônio que está relacionado com a regulação do ciclo estral e manutenção da gestação. Estudos indicam que a progesterona plasmática afeta a qualidade do oócito, portanto, quando são recuperados na fase de diestro são mais competentes. De maneira geral, a progesterona permite que os folículos sejam expostos a um longo período de luteólise, ou seja, quando os pulsos hormonais de LH estão em baixa, obtendo assim um oócito de melhor qualidade citoplasmática. Dessa forma, o trabalho teve como objetivo avaliar se a presença do corpo lúteo (CL) em ovários de doadoras gestantes/prenhas e não-gestantes/vazias influenciaria na quantidade de blastocistos produzidos *in vitro*. O trabalho foi realizado no Laboratório de Produção *In Vitro* de Embriões, localizado no município de Alta Floresta – MT. No total, novecentos e sessenta e cinco oócitos viáveis foram recuperados de fêmeas da raça nelore (*Bos taurus indicus*), sem idade definida, provenientes de abatedouro local e transportados para o laboratório em sacos plásticos (respeitando a divisão dos grupos), dentro de uma garrafa térmica com solução salina a 38°C. Através da aspiração folicular dos ovários, foi possível recuperar de doadoras prenhas com CL (PCCL - Grupo 1) 333 oócitos, prenhas sem CL (PSCL - Grupo 2) 307 oócitos, vazias com CL (VCCL - Grupo 3) 210 oócitos e vazias sem CL (VSCL - Grupo 4) 115 oócitos. Posteriormente, as demais etapas (MIV, FIV e CIV) também foram realizadas respeitando a distinção entre os quatro grupos. Todas as variáveis, referente a quantidade de estruturas clivadas (C) e dos embriões durante o sexto e sétimo dia de desenvolvimento (D6 e D7), foram inicialmente testadas quanto a normalidade, para definição do teste a ser utilizado. As variáveis quantitativas com distribuição normal foram avaliadas por ANOVA, e as diferenças entre os grupos comparadas pelo teste t, com $p < 0,05$. Não houve diferença significativa entre os quatro grupos em relação aos três estágios de desenvolvimento embrionário (C-P= 0,0543; D6-P=0,2287 e D7-P= 0,3455). Mediante aos resultados conclui-se que, o desenvolvimento embrionário se manteve igual em condições *in vitro*. Apesar de não haver diferença no presente estudo em relação a produção dos embriões nos quatro tratamentos, a presença de CL possui um grande potencial de gerar um impacto positivo na qualidade dos embriões produzidos e consequentemente, melhorar as taxas de gestação. No entanto é necessário que haja trabalhos futuros com o objetivo de avaliar a qualidade embrionária de cada grupo.

Palavras-chave: Biotecnologia; Eficiência Ovariana; Oócitos; Blastocistos; Reprodução Animal.

1567

Área: Morfologia

1568

9.2.3 XV Semana da Biologia de Alta Floresta (SEBAF)

1569



Efeitos da redução do soro fetal bovino (SFB) como fonte proteica durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos na produção de blastocistos.

A produção *in vitro* (PIVE), em bovinos, é uma biotécnica aplicada a reprodução animal e envolve a recuperação dos complexos *cumulus*-oócitos (CCO), maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV). Essa biotécnica ainda possui limitações quantitativas e qualitativas que, provavelmente muitas delas estão relacionados a exposição dos CCO ao sistema *in vitro*. Neste contexto, são preconizados meios de MIV (TCM-199) suplementados com hormônios, fontes proteicas e antioxidantes. As fontes proteicas fornecem aos meios de cultivo um conjunto de moléculas que promovem o crescimento embrionário, como é o caso soro fetal bovino (SFB). Apesar do SFB ter efeitos sabidamente positivos, apresenta limitações importantes, tais como a dificuldade na padronização dos lotes, o risco de veiculação de patógenos, acúmulo anormal de gotas lipídicas e altos níveis de mitocôndrias imaturas em embriões produzidos *in vitro* que, conseqüentemente, trarão problemas após a criopreservação. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se a redução do SFB, suplementado na MIV influenciaria a clivagem (C), taxa de blastocistos no sétimo dia de desenvolvimento (D7) e a taxa de eclosão no décimo dia de desenvolvimento (D10). Os ovários coletados eram de fêmeas da raça nelore (*Bos taurus indicus*), sem idade definida, provenientes de abatedouro local, transportados para o centro de produção *in vitro* de embriões (CPIVE) do laboratório Norte Embryo, localizado no município de Alta Floresta - MT. Através da aspiração folicular, foi recuperado em três réplicas, CCO imaturos de grau I, que foram distribuídos em dois grupos (G) distintos: G1, CCO (N=317) maturados a 10% de SFB (controle) e G2, CCO (N=317) maturados a 1% de SFB. Após 22 horas de MIV foi realizada a fertilização *in vitro* (FIV), com sêmen de touro da raça *Aberdeen Angus*, obtidas de centrais especializadas. Após 20 horas de FIV, foi realizado o cultivo *in vitro* (CIV), respeitando a distinção entre os grupos. Os dados do desenvolvimento embrionário (C, D7 e D10) foram analisados utilizando o Proc GLIMMIX (SAS Institute), os resultados foram apresentados em média±erro padrão. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) sobre as taxas de C ($73\% \pm 1,3$ e $69\% \pm 1,1$), D7 ($44\% \pm 1,2$ e $39\% \pm 1,0$) e D10 ($79\% \pm 0,9$ e $80\% \pm 0,9$) entre G1 e G2, respectivamente. Portanto, os resultados demonstram que, a redução do SFB remete a novas hipóteses em relação a necessidade de determinadas concentrações de componentes no meio de MIV, muito utilizados nos atuais sistemas *in vitro*, e se o lema “menos é mais” pode gerar um impacto positivo na qualidade dos embriões produzidos e conseqüentemente, elevar as taxas de gestação e sobrevivência pós criopreservação. No entanto, é necessário que haja continuidade no presente trabalho.

Palavras-chave: Biotecnologia, Oócitos; Blastocistos; Reprodução Animal.

Área: Morfologia

1570

1571

9.2.4 XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE)

1572

Abstracts - 35th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)
OPU-IVF and ET
Transfer of two in vitro produced F1 Angus x Nelore embryos does not improve pregnancy rates: preliminary data

Luany Alves Galvão Martinhão ^{1,4}, João Gabriel Viana de Grázia ^{2,4}, Leticia Prates Martins ^{1,5}, Ismael do Nascimento Garcia ^{3,4}, Dhonata Nunes Ribas ^{3,4}, Wilson Pardini Saliba ², Roberti Martins Drummond ², Antônio Carlos Nogueira de Góis ², Felipe Ranzini De Col ⁴, João Henrique Moreira Viana ⁵

¹ UnB - Universidade de Brasília (Brasília, DF, Brazil), ² AB - FIVx Apoyar Biotech (Juiz de Fora, MG, Brazil), ³ UNEMAT - Universidade do Estado do Mato Grosso (Alta Floresta, MT, Brazil), ⁴ NE - Norte Embryo (Alta Floresta, MT, Brazil), ⁵ CENARGEN - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF, Brazil)

Resumo

The transfer of two embryos to a single recipient has been proposed to increase calving rates in cattle. In dairy cattle, twin pregnancies are associated with higher incidence of pregnancy losses and dystocia, and the use of double embryo transfer (ET) is controversial. However, this strategy remains to be evaluated in crossbred beef cattle, particularly in programs using large-scale in vitro embryo production (IVP) with Y-sorted semen. The aim of this study was to compare the transfer of a single or two F1 Nelore x Angus embryos to Nelore breed recipients. Cumulus-oocyte complexes (COC) recovered from slaughterhouse ovaries and morphologically classified as grade I were used. The COC were IVM and IVF in the same culture conditions (38,5°C, 5,5% CO₂). Sex-sorted sperm from a single Angus sire with known fertility was used for IVF. The presumptive zygotes were cultured under low oxygen concentration (5,5% CO₂, 5,5% O₂, at 38,5° C). Embryos (n=1,025) were classified according to the developmental stage and transferred at days 6, 7 or 8, according to the availability of synchronized recipients. A single (n=667) or two embryos (n=358, 179 ET) were transferred to 846 recipients. In this estudy only fresh embryos were transferred. The embryos transferred together were loaded in a single straw, and recorded based on embryo classification (i.e., BLBL, BXB, etc.). Pregnancy diagnosis was performed by ultrasonography approximately 38 days after ET. Data were evaluated by the Chi-squared method using the SAS software (SAS Institute). The overall pregnancy rate was 50,8% (430/846), which did not differ between recipients receiving a single or two embryos (50,5% [337/667] vs 52,0% [93/179]; P=0.0633). In both cases, transfer of embryos that reached the expanded blastocyst stage earlier (i.e., BX at day 6 vs BX at day 7 or BXB at day 6 vs. BXB at day 7) resulted in higher pregnancy rates (P<0.0001). When data were pooled, the inclusion of a more developed embryo in double transfers (BXL vs BLBL at day 7; or BEBX vs BXB at day 8) did not improve pregnancy rate (63,9% vs. 50,0%, P=0.3681). In summary, the transfer of two embryos does not improve pregnancy rate, which is mostly dependent on individual embryo developmental potential. The further calving rates will be used to evaluate whether this strategy (double ET) is worthy in beef cattle.

Acknowledgements

CAPES, DPG UnB and FAPDF.

1573

1574
1575

9.2.5 11th International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS)

Replacing fetal calf serum by yeast extract during *in vitro* embryo culture: preliminary results

Bovine fetal calf serum (BFS) is broadly used as a medium supplement during *in vitro* embryo production. However, there is an intrinsic sanitary risk associated with the use of animal sources of macromolecules. The aim of the present study was to evaluate the replacement of FCS by yeast extract (YE) during *in vitro* embryo culture. Bovine cumulus oocyte complexes (COC, n=1,377) obtained from slaughterhouse ovaries (mostly from Nelore breed cows, *Bos indicus*) were *in vitro* matured during 22h and submitted to *in vitro* fertilization during 20h, using the standard protocols of the commercial laboratory Norte Embryo, located in Alta Floresta, Brazil. The presumptive zygotes were randomly distributed into five experimental groups, all submitted to *in vitro* culture (IVC) in SOF media added with BSA and supplemented with: G1, 3% FCS (positive control, n=282); G2, no supplement (negative control, n=285); G3, 0.1mg/mL YE (n=271) during all IVC; G4, 0.1mg/mL YE only up to day 3 of IVC (n=267); and G5, 0.1mg/mL YE up to day 3 and 3% FCS from days 3 to 9 of IVC (n=272). Cleavage rate was evaluated at day 3, blastocyst rate at day 7, and hatching rate at day 9. Five replicates were performed for each treatment. Data were analyzed using the Proc Glimmix of the SAS software, considering the effects of treatment, replica, and interactions. There was no effect ($P>0.05$) of replica for any of the endpoints analyzed. Cleavage rates were similar among groups ($81.9\% \pm 1.1$; $76.1\% \pm 1.3$, $84.1\% \pm 1.0$, $80.9\% \pm 0.8$, and $82.4\% \pm 0.8$ for G1, G2, G3, G4 and G5, respectively; $P=0.6424$). Greater ($P=0.0016$) blastocyst rates were obtained when YE was used up to day 3 of IVC and FCS from day 3 to day 7 (G5: $47.4\% \pm 0.8$ vs. G1: $43.6\% \pm 0.9$, G2: $29.8\% \pm 0.7$, G3: $32.8\% \pm 0.6$ and G4: $30.0\% \pm 0.9$). The hatching rates in groups supplemented with FCS (G1: $74.0\% \pm 0.8$) and with YE up to day 3 without (G4: $70.0\% \pm 0.8$) or with (G5: $76.0\% \pm 0.8$) FCS from days 3 to 9 were similar ($P>0.05$), but greater ($P=0.0073$) than those obtained in groups without any supplementation (G2: $48.2\% \pm 0.5$) or supplemented with YE during all IVC (G3: $61.8\% \pm 0.7$). The present results suggest that YE supplementation had no negative impact on cleavage or on blastocyst rates. However, the potential beneficial effects of YE supplementation on blastocyst and hatching rates may depend on the period of IVC in which YE is used.

Acknowledgements: FAPDF, Norte Embryo Laboratory, Apoyar Biotech, PPG BioAni of UNB.

Key words: *in vitro* embryo production, media supplementation, cattle

1576

1577
1578

9.2.6 XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE)

Cryotolerance and lipid droplet accumulation in bovine embryos cultured *in vitro* in the presence of fetal calf serum or yeast extract: preliminary results

Luany Alves Galvão Martinhão¹, João Gabriel Viana de Grázia², Leticia Prates Martins¹, Otávio Augusto Costa de Faria¹, Dhonata Nunes Ribas³, Ismael do Nascimento Garcia³, João Henrique Moreira Viana⁴

¹Universidade de Brasília, ²Apoyar Biotech, ³Universidade do Estado de Mato Grosso, ⁴Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

e-mail: luany.galvao@gmail.com

The use of bovine fetal calf serum (FCS) as a medium supplement is associated with greater embryo rates, but also with lower cryotolerance and large offspring syndrome. Different supplements have been tested as potential alternatives for FCS. Results of the dose-response our group reveals that the yeast extract (YE) can be used during the *in vitro* culture (IVC) at 1% (0.1mg/mL). The aim of the study was to evaluate lipid droplet accumulation and embryo hatching after cryopreservation when FCS has replaced by YE 1%. Bovine *cumulus* oocyte complexes (COC) were recovered from slaughterhouse ovaries (Nelore breed, *Bos indicus*). *In vitro* maturation and fertilization were performed for 22h and 20h, respectively, following the standard protocols of the commercial North Embryo laboratory - Alta Floresta, Brazil. The presumptive zygotes were randomly distributed into five groups, all submitted to IVC in SOF media added with BSA (3mg/mL) from days 1 to 9 and supplemented with: G1, 3% FCS (n=282); G2, no supplement (n=285); G3, YE 1% (n=271) during all IVC; G4, YE 1% only up to day 3 of IVC (n=267) and G5, YE 1% up to day 3 and 3% FCS from days 3 to 9 of IVC (n=272). Lipid droplet accumulation was evaluated in a subset of day-7 blastocysts (n=92 in four replicates). Hatching rate at day 9 of IVC was evaluated on fresh blastocysts (n=506 in five replicates) and on vitrified-warmed embryos (n=360 in nine replicates). Data were analyzed using the Glimmix procedure (SAS software), considering the effects of treatment, replicate, and their interaction. There was no replicate effect ($P>0.05$) for any of the endpoints analyzed. Cultured embryos without supplementation (G2) presented lesser lipid droplets than those supplemented with FCS, YE 1% or YE 1% + FCS (G2: $7.6\pm 1.1a$ vs. G1: $14.8\pm 1.3bc$; G3: $15.5\pm 1.5bc$; G4: $17.2\pm 2.3c$, $P=0.0001$), excepting the YE 1% up to day 3 of IVC (G5: $9.6\pm 1.2ab$), being similar; embryos were stained with Bodipy and evaluated under a laser-scanning confocal microscope. Greater hatching rates after blastocyst vitrification-warming were obtained when FCS was used throughout CVI (G1: $78.9\pm 0.6a$; vs. G2: $39.4\pm 0.7b$ G3: $46.6\pm 0.7b$ G4: $51.3\pm 0.8b$ and G5: $32.8\pm 0.8b$, $P=0.0001$). For fresh blastocysts, the hatching rate of the group supplemented with FCS (G1: $74.0\pm 0.8a$) was similar ($P>0.05$) to those supplemented with YE 1% throughout IVC (G3: $61.8\pm 0.7ab$) or with YE up to day 3 followed (G5: $70.0\pm 0.8a$) or not (G4: $76.0\pm 0.8a$) by FCS from days 3 to 9, but greater ($P=0.0073$) than in groups without supplementation (G2: $48.2\pm 0.5b$). In summary, the potential effects of YE during IVC depend on the fate of the embryos (fresh or vitrified). In fresh blastocysts, YE didn't impair hatching. However, when blastocysts aren't supplemented or to with YE, it causes a reduction in hatching after vitrification-warming compared to with FCS, suggesting that cryotolerance is affected by factors other than lipid accumulation, for example, nutrient insufficient.

1579

1580
1581
1582
1583
1584

Acknowledgments: FAPDF, Norte Embryo Laboratory, Apoyar Biotech, PPG BioAni of UnB.

Key words: Cattle, Cryopreservation, Media supplementation.