



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CAMILA MUNIZ CAVALCANTI

EFEITO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MATURAÇÃO E CULTIVO *IN*
***VITRO* SOBRE A PRODUÇÃO QUANTI-QUALITATIVA DE EMBRIÕES**
BOVINOS

FORTALEZA – CEARÁ
2018

CAMILA MUNIZ CAVALCANTI

EFEITO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MATURAÇÃO E CULTIVO *IN VITRO*
SOBRE A PRODUÇÃO QUANTI-QUALITATIVA DE EMBRIÕES BOVINOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias. Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas

Coorientadora: Profa. Dra. Luciana Magalhães Melo

FORTALEZA – CEARÁ
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Cavalcanti, Camila Muniz.

Efeito de diferentes sistemas de maturação e cultivo in vitro sobre a produção quanti-qualitativa de embriões bovinos [recurso eletrônico] / Camila Muniz Cavalcanti. - 2018.

1 CD-ROM: il.; 4 ¾ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 61 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2018.

Área de concentração: Reprodução e Sanidade Animal.
Orientação: Prof. Ph.D. Vicente José de Figueiredo

Freitas.

Coorientação: Prof.^a Ph.D. Luciana Magalhães Melo.

1. incubadora. 2. tensão de oxigênio. 3. espécies reativas de oxigênio. I. Título.

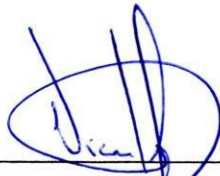
CAMILA MUNIZ CAVALCANTI

EFEITO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MATURAÇÃO E CULTIVO *IN VITRO*
SOBRE A PRODUÇÃO QUANTI-QUALITATIVA DE EMBRIÕES BOVINOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias. Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Aprovada em: 20 de fevereiro de 2018

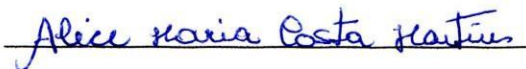
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas
(Orientador)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)



Prof. Dr. Rafael Rossetto de Sousa
(Examinador)
Universidade Estadual do Ceará
(UECE)



Profa. Dra. Alice Maria Costa Martins
(Examinadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*À minha família, Norma, Fábio,
Janaina, Maria Fátima e Nair (in
memoriam), por todo amor e
dedicação.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu grande guia, que me abençoa e está presente em cada passo e decisão tomada. Por recuperar minhas forças, iluminar meus pensamentos e por fazer de mim uma pessoa cada vez melhor.

A Nossa Senhora das Graças, por ouvir minhas preces, interceder por mim, sarar minhas angústias e acalmar meu coração.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo concedida e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro para realização dos experimentos.

À Universidade Estadual do Ceará (UECE), ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) e à Faculdade de Veterinária (FAVET), professores e funcionários, pela oportunidade de realizar o curso e por fornecerem todas as condições para minha capacitação profissional. Ao Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR) da UECE, pelo suporte técnico e estrutural durante toda a realização do curso e para a execução deste projeto.

Aos meus pais, Fábio e Norma, pelo amor incondicional e exemplo de integridade, dedicação e força, além de incentivo e apoio em minhas decisões. À minha incrível irmã, Janaina, por toda paciência e carinho, pelo exemplo de caráter e pela boa influência em todos os aspectos da minha vida. À minha tia, Maria Fátima, e minha avó, Nair, pelo imenso amor, doçura e cuidado e pela dedicação durante toda minha criação. Ao meu orientador, prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas, pela confiança e oportunidade de fazer parte da equipe LFCR. Especialmente por todos os ensinamentos, paciência e grande exemplo de competência, zelo e amor pelo ensino e pesquisa.

À minha coorientadora, profa. Dra. Luciana Magalhães Melo, por auxiliar todas as etapas da pesquisa, pelos conselhos e questionamentos e pela valiosa contribuição na execução do projeto e escrita do artigo.

Ao prof. Dr. Dárcio Ítalo Alves Teixeira, pelo apoio e incentivo durante todo o curso.

À banca examinadora, prof. Dr. Rafael Rossetto de Sousa e Dra. Alice Maria Costa Martins, por ter aceitado o convite e pelas importantes sugestões e contribuições para melhorar este trabalho.

Aos meus amigos do LFCR/LADIAR e mestrado, Iana, Mirelly, João Victor, Thiago, Thais, Lívia, Ana Clara, Samara, Fabiana, Maurício, Jeferson, Beatriz, Eduarda, Aniele e Yara, por todo apoio e por tornarem a caminhada mais leve com muito companheirismo, abraços e risadas. E especialmente aos que me ajudaram na execução das rotinas experimentais. Não conseguiria sem vocês.

Aos senhores Osmar, Mário e Firmino, por permitirem a colheita do material biológico utilizado nos experimentos. Agradeço também aos animais que foram fonte da pesquisa. A todos aqueles que me incentivaram, que serviram de inspiração, que torceram, e que contribuíram, direta ou indiretamente, com a execução deste trabalho. Obrigada!

RESUMO

Embora a produção *in vitro* de embriões (PIVE) tenha sido uma ferramenta muito utilizada para a multiplicação de bovinos geneticamente superiores, vários estudos já demonstraram que as condições de cultivo podem influenciar o sucesso da técnica. Além disso, em condições de campo torna-se interessante equipamentos portáteis que possam facilitar o transporte de oócitos/embriões nas condições mais favoráveis. Assim, este trabalho teve por objetivo verificar a eficiência da PIVE bovina em três diferentes sistemas de incubação: incubadora convencional de bancada (CONV), mini-incubadora de bancada (MINI) e mini-incubadora portátil (PORT). Para tanto, complexos *cumulus*-oócito (CCOs) foram obtidos de ovários de abatedouros e divididos aleatoriamente em três grupos: CONV com oxigênio elevado (5% CO₂), MINI e PORT, ambas com baixa tensão de oxigênio (5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂), e submetidos à maturação *in vitro* (MIV) por 22 h. Após a MIV, parte dos CCOs foi submetida à marcação com Hoechst 33342 para avaliação da taxa de maturação. As estruturas restantes foram submetidas à fecundação *in vitro* (FIV) por 6 h seguido de cultivo *in vitro* (CIV) por 8 dias. A taxa de clivagem foi avaliada no dia dois (D2) e a taxa de blastocistos nos dias sete (D7) e oito (D8) de cultivo. Adicionalmente, oócitos pós-MIV e embriões (D2 e D7) foram corados com H₂DCFDA para avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela avaliação das unidades arbitrárias de fluorescência (UAFs). As taxas de maturação oocitária, clivagem, blastocistos expandidos/eclodidos e o número total de células por blastocisto foram avaliadas por ANOVA *one-way*, enquanto os níveis de EROs pelo teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância foi de 5%. Não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) quanto à taxa de maturação (70,4%, 50,8% e 57,6% para CONV, MINI e PORT, respectivamente). Quanto à taxa de clivagem, o sistema CONV (74,0%) resultou na maior porcentagem ($P < 0,05$) quando comparado ao sistema PORT (59,5%), mas similar ($P > 0,05$) ao sistema MINI (65,0%). O mesmo padrão e diferença significativa foi observado para taxa de blastocistos em D7: CONV (33,3%), MINI (32,3%) e PORT (21,9%). Em relação aos níveis de EROs (UAFs $\pm$ EPM), os oócitos pós-MIV não mostraram diferença significativa ($P > 0,05$) quando da comparação dos grupos CONV (35,6 $\pm$ 4,5), MINI (29,4 $\pm$ 4,0) e PORT (35,6 $\pm$ 4,5). Para embriões D2, os níveis de EROs foram mais altos ($P < 0,05$) no grupo MINI (44,2 $\pm$ 3,1) em comparação ao CONV (27,7 $\pm$ 3,7) e PORT (33,3 $\pm$ 3,2). Todavia, nenhuma

diferença significativa ($P > 0.05$) foi observada em embriões D7: $45,0 \pm 3,5$; $48,1 \pm 3,9$ e $43,3 \pm 3,3$ para CONV, MINI e PORT, respectivamente. Concluindo, o sistema PORT foi capaz de obter embriões de PIVE embora não eficientemente como o CONV. Adicionalmente, embora um elevado nível de EROs foi observado em embriões D2 do sistema MINI, este foi tão eficiente quanto o CONV na produção de blastocistos. Tal sistema pode ser uma opção mais econômica para a indústria de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Palavras-chave: Incubadora. Tensão de oxigênio. EROs.

ABSTRACT

Although embryo *in vitro* production (IVP) has been a widely used tool for the multiplication of genetically superior cattle, several studies have already shown that culture conditions may influence the success of the technique. Moreover, in field conditions it becomes interesting portable equipment that can facilitate the transport of oocytes / embryos under the most favorable conditions. The objective of this study was to verify the efficiency of bovine IVP in three different incubation systems: conventional bench incubator (CONV), bench mini-incubator (MINI) and portable mini-incubator (PORT). The *cumulus*-oocyte complexes (COCs) were obtained from slaughterhouses ovaries and randomly divided into three groups: CONV with high oxygen (5% CO₂), MINI and PORT, both with low oxygen tension (5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂), and submitted to *in vitro* maturation (IVM) for 22 h. After IVM, part of the COCs was subjected to Hoechst 33342 labeling to evaluate the maturation rate. The remaining structures were submitted to *in vitro* fertilization (IVF) for 6 h followed by *in vitro* culture (IVC) for 8 days. The cleavage rate was assessed on day two (D2) and the rate of blastocysts on days seven (D7) and eight (D8) culture. The cleavage rate was assessed on day two (D2) and the rate of blastocysts on days seven (D7) and eight (D8) culture. In addition, post-IVM oocytes and embryos (D2 and D7) were stained with H₂DCFDA to evaluate the levels of reactive oxygen species (ROS) by the evaluation of arbitrary fluorescence units (AFUs). The rates of oocyte maturation, cleavage, expanded/hatched blastocysts and the total number of cells per blastocyst were evaluated by one-way ANOVA, while the levels of ROS by the Kruskal-Wallis test. The level of significance was 5%. No significant difference ($P > 0.05$) was observed in the maturation rate (70.4%, 50.8% and 57.6% for CONV, MINI and PORT, respectively). Regarding the cleavage rate, the CONV system (74.0%) resulted in the highest percentage ($P < 0.05$) when compared to the PORT system (59.5%), but similar ($P > 0.05$) to the MINI system (65.0%). The same pattern and significant difference was observed for the rate of blastocysts in D7: CONV (33.3%), MINI (32.3%) and PORT (21.9%). Regarding the ROS levels (AFUs $\pm$ SEM), post-IVM oocytes did not show a significant difference ($P > 0.05$) when comparing CONV (35.6 $\pm$ 4.5), MINI (29.4 $\pm$ 4.0) and PORT (35.6 $\pm$ 4.5). For D2 embryos, ROS levels were higher ($P < 0.05$) in the MINI group (44.2 $\pm$ 3.1) compared to CONV (27.7 $\pm$ 3.7) and PORT (33.3 $\pm$ 3.2). However, no significant difference ($P > 0.05$) was observed in D7 embryos: 45.0

± 3.5 ; 48.1 ± 3.9 and 43.3 ± 3.3 for CONV, MINI and PORT, respectively. In conclusion, the PORT system was able to obtain IVP embryos although not efficiently as the CONV. In addition, although a high level of ROS was observed in D2 embryos of the MINI system, it was as efficient as the CONV in the production of blastocysts. Such a system may be a more economical option for the *in vitro* produced bovine embryo industry.

Keywords: Incubator. Oxygen tension. ROS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1 - Estratégia metabólica do embrião pré-implantacional. A alteração na tensão de O₂ deve ser consistente com a mudança na estratégia metabólica do embrião no momento da ativação do genoma embrionário..... 27**
- Figura 2 - Figura 2. Modelos de incubadoras utilizadas no cultivo *in vitro* de embriões bovinos. A: modelo convencional com grande volume. B: modelo mini de bancada utilizando mistura de gases. 28**

CAPÍTULO 1

- Figure 1 - ROS levels (mean $\pm$ SEM) in post-IVM oocytes and embryos (at D2 and D7) cultured in different incubation systems (conventional-CONV, mini bench-MINI and portable-PORT) and stained with H₂DCFDA. Different letters denote statistical difference ($p < 0.05$)...... 40**
- Figure 2 - Representative images ($\times 100$) of post-IVM oocytes and embryos (at D2 and D7) cultured in different incubation systems (conventional-CONV, mini bench-MINI and portable-PORT) and stained with H₂DCFDA. Bright field (left column) and fluorescence (right column) are showed for each developmental stage. The green fluorescence indicates arbitrary fluorescence units of ROS levels..... 41**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1 -	Effect of incubation system (conventional-CONV, mini bench-MINI and portable-PORT) on development of <i>in vitro</i> produced bovine embryos.....	40
------------------	--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFUs	<i>Arbitrary fluorescence units</i> (Unidades arbitrárias de fluorescência - UAFs)
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de variância)
BO	Brackets-Oliphant
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Albumina sérica bovina)
CC	Células do <i>cumulus</i>
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Hidróxido de carbono
COCs	<i>Cumulus-oocyte complex</i> (Complexo <i>cumulus</i> -oócito)
CR	Charles Rosenkrans
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (Fator de crescimento epidermal)
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Soro fetal bovino – SFB)
FSH	<i>Follicle stimulating hormone</i> (Hormônio folículo estimulante)
FUNCAP	Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
H ₂ DCFDA	<i>6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i> (Diacetato 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluoresceína)
HO ₂	Radical hidropéroxido
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide (Péroxido de hidrogênio)
IVC	<i>In vitro</i> culture (Cultivo <i>in vitro</i> – CIV)
IVF	<i>In vitro</i> fertilization (Fecundação <i>in vitro</i> – FIV)
IVM	<i>In vitro</i> maturation (Maturação <i>in vitro</i> – MIV)
IVP	<i>In vitro</i> production (Produção <i>in vitro</i> – PIV)
LH	<i>Luteinizing hormone</i> (Hormônio luteinizante)
MOET	<i>Multiple ovulation and embryo transfer</i> (Múltipla ovulação e transferência de embriões – MOTE)
N ₂	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de Sódio
O ₂	<i>Oxygen</i> (Oxigênio)
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido

OH·	Radical hidroxila
OPU	<i>Ovum pick-up</i> (Colheita de oócitos)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato-salino)
PVP	<i>Polyvinyl alcohol</i> (Álcool polivinílico)
REDOX	Redução e oxidação
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Espécies reativas de oxigênio - EROs)
SOF	<i>Synthetic oviductal fluid</i> (Fluido sintético do oviduto - SOF)
TCM	<i>Tissue culture medium</i> (Meio de cultivo de tecido)
TALP	Tyrode's-albumina-lactato-piruvato
UV	<i>Ultraviolet</i> (Ultravioleta)

LISTA DE SÍMBOLOS

@	Arroba
g	Força gravitacional
°C	Grau Celsius
h	Horas
μg	Micrograma
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
min	Minuto
nm	Nanômetro
w/v	Peso por volume
s	Segundo
IU	Unidades Internacionais
vs	Versus
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS.....	20
2.1.1	Fonte de oócitos.....	21
2.1.2	Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos.....	21
2.1.3	Fecundação <i>in vitro</i> dos oócitos.....	22
2.1.4	Cultivo <i>in vitro</i> dos presumíveis zigotos.....	22
2.2	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ESTRESSE OXIDATIVO.....	24
2.2.1	Tensão de oxigênio na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	25
2.3	SISTEMAS PORTÁTEIS PARA A PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	27
3	JUSTIFICATIVA.....	29
4	HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	30
5	OBJETIVOS.....	31
5.1	GERAL.....	31
5.2	ESPECÍFICOS.....	31
6	CAPÍTULO 1.....	32
7	CONCLUSÕES.....	49
	PERSPECTIVAS.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51
	APÊNDICES.....	59
	APÊNDICE A - EVALUATION OF DIFFERENT INCUBATION SYSTEMS ON BOVINE <i>IN VITRO</i> EMBRYO PRODUCTION.....	60

APÊNDICE B - AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS EM DIFERENTES SISTEMAS DE MATURAÇÃO E CULTIVO.....	62
---	----

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura brasileira é um dos setores mais importantes do agronegócio e, conseqüentemente, da economia nacional. O Brasil possui o maior rebanho comercial e segundo maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças. Além disso, desde 2004, o Brasil é o maior exportador de carne bovina, segundo maior produtor de carne e sexto maior produtor de leite mundial (BRASIL, 2017).

Nesse contexto, as biotécnicas aplicadas à reprodução animal têm contribuído bastante para a produção bovina. Dentre essas biotécnicas, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem sido utilizada para acelerar a multiplicação de animais geneticamente superiores, impedir o descarte precoce de fêmeas de alto padrão zootécnico e preservar raças ou linhagens importantes (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Além disso, a PIVE possui ampla aplicação na pesquisa, como no estudo da clonagem, sendo ainda os oócitos de animais de produção, como a espécie bovina, utilizados como modelo experimental (HASLER, 2014).

O Brasil é líder mundial na PIVE em bovinos, pois em 2013 cerca de 70% dos embriões produzidos *in vitro* no mundo foram obtidos no Brasil (IETS, 2015). Apesar do aumento na demanda e na acessibilidade da PIVE, as taxas de mortalidade embrionária precoce prejudicam a eficiência deste procedimento e quaisquer vantagens econômicas associadas. Embora a maioria de embriões produzidos *in vitro* tenha uma boa taxa de clivagem, apenas 30 a 40% dos zigotos desenvolvem até o estágio de blastocisto (LONERGAN *et al.*, 2006; PERKEL *et al.*, 2015), sugerindo que fatores que atuam no desenvolvimento embrionário inicial influenciam as taxas de viabilidade embrionária.

O desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* é fortemente influenciado pelas condições de cultivo. Há evidências de que condições na composição do ar em que os embriões são expostos durante as etapas de PIVE podem afetar sua qualidade. Na maioria das espécies de mamíferos, os embriões em primeiros estágios de desenvolvimento encontram-se no lúmen do oviduto, onde há menor tensão de oxigênio (1,5 a 8,5% O₂) quando comparado com o ar atmosférico (aproximadamente 20%; BANWELL *et al.*, 2007). Apesar disso, as condições de oxigênio atmosférico têm sido utilizadas rotineiramente para cultura de embriões de mamíferos. Tensões suprafisiológicas de oxigênio podem aumentar a formação de espécies reativas de

oxigênio (EROs) durante as etapas de PIVE (BAVISTER, 1995), gerando estresse oxidativo. Por esse motivo, muitos esforços vêm sendo realizados para se obter métodos de cultivo cada vez menos prejudiciais aos oócitos e embriões (YUAN *et al.*, 2003; CORRÊA *et al.*, 2008; GASPAR *et al.*, 2015).

A distância e o tempo decorrido no transporte dos embriões entre as grandes fazendas produtoras de gado e os laboratórios são reconhecidos como fatores limitantes para o sucesso da PIVE. Nesse contexto, são necessárias pesquisas que buscam solucionar problemas envolvidos no transporte de embriões, como o controle da tensão de oxigênio durante o transporte (PONTES *et al.*, 2011; LOIOLA *et al.*, 2014).

Este trabalho irá apresentar, primeiramente, uma revisão de literatura tratando sobre os temas relacionas à PIVE na espécie bovina e com especial atenção à produção de EROs durante o referido processo. Posteriormente, será apresentado o estudo experimental que deu origem ao manuscrito submetido para publicação. Finalmente, serão apresentadas as conclusões gerais e as perspectivas que se apresentam após os resultados obtidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

A PIVE foi desenvolvida inicialmente como uma ferramenta de investigação científica para o estudo da reprodução e foi aplicada para resgatar oócitos em folículos de doadoras abatidas, e como poderoso modelo de fecundação e desenvolvimento embrionário em várias espécies. Em bovinos, além desta utilização, a PIVE tornou-se importante para a produção de embriões a partir de doadoras vivas, como uma alternativa devido à flexibilidade e as vantagens que esta técnica oferece (HASLER, 2014).

O processo de PIVE envolve as etapas de colheita de oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) de embriões fora do útero animal. Aproximadamente 90% dos oócitos colhidos e submetidos à maturação *in vitro* (MIV) retomará a meiose e atingirá a maturação, com cerca de 80% de zigotos chegando a primeira clivagem para entrar na fase de duas células (LONERGAN; FAIR, 2016). Embora a maioria destes embriões produzidos *in vitro* atinja a clivagem, apenas 30 a 40% de zigotos desenvolvem até a fase de blastocisto (LONERGAN *et al.*, 2006), sugerindo que fatores que atuam no desenvolvimento embrionário precoce influenciam as taxas de blastocistos e viabilidade embrionária.

Apesar destas taxas de desenvolvimento modestas, existem várias aplicações para a PIVE. As fêmeas que não respondem aos tratamentos de superovulação convencionais por razões como a raça, protocolo utilizado e tempo de administração de protocolos hormonais podem superar a subfertilidade (LANGBEEN *et al.*, 2015). A PIVE também tem sido amplamente utilizada para preservar o material genético de animais geneticamente superiores com doenças terminais (GALLI *et al.*, 2003), na preservação de espécies que estão ameaçadas de extinção (LOCATELLI *et al.*, 2012) e na ampliação de biotecnologias como clonagem e trangênese (KHAZAEI; AGHAZ, 2017).

Na última década, a PIVE superou a técnica de múltipla ovulação e transferência embrionária (MOTE) e tornou-se a técnica de escolha na produção de embriões bovinos (VIANA *et al.*, 2012), especialmente por ser mais utilizada em raças zebuínas, as quais fisiologicamente possuem uma maior população folicular,

maior recuperação de oócitos por aspiração e, conseqüentemente, maior produção embrionária (PONTES *et al.*, 2010).

2.1.1 Fonte de oócitos

A obtenção dos oócitos é etapa fundamental para a realização da PIVE. Em bovinos, os oócitos podem ser obtidos por método *post mortem* ou *in vivo*. O método *post mortem* é feito a partir de ovários em abatedouros, sendo a fonte de oócitos de menor custo e mais abundante para a produção de embriões em larga escala (LOPERA-VASQUEZ *et al.*, 2017). A partir desta fonte, metodologias de recuperação como *slicing* e aspiração folicular com agulha hipodérmica acoplada a uma seringa ou a uma bomba de vácuo proporcionam um número suficiente de oócitos para estudos *in vitro* (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). A maior desvantagem desta fonte é a inacessibilidade de informações importantes da fêmea doadora, como idade, escore corporal e nutrição, fatores que podem influenciar a qualidade dos oócitos obtidos.

O método *in vivo* utilizada para obtenção de oócitos é realizado através da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia em fêmeas vivas. Neste método, realiza-se a aspiração a partir da introdução de uma agulha no interior dos folículos ovarianos, com o auxílio de um ecógrafo e um transdutor acoplado a um guia de aspiração. Um sistema de bomba a vácuo permite a colheita dos oócitos e do líquido folicular (FERRAZ *et al.*, 2015).

Após a obtenção de oócitos, a PIVE apresenta três etapas metodológicas que compreendem os seguintes procedimentos, descritos em sequência: maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV).

2.1.2 Maturação *in vitro* dos oócitos

A MIV promove alterações no oócito que o torna apto à fecundação. Esta etapa envolve as maturações nuclear, citoplasmática e molecular, durante as quais ocorre rearranjo nas organelas e síntese de RNA mensageiro. Somente uma pequena proporção de oócitos maturados *in vitro* pode completar a maturação citoplasmática, conferindo a habilidade para suportar o desenvolvimento embrionário inicial (LONERGAN; FAIR, 2016).

A tecnologia para MIV de oócitos tem melhorado e se estabelecido gradualmente para PIVE nos últimos 30 anos. Além disso, com a melhoria dos meios de cultivo e protocolos da MIV, houve um progresso considerável nas taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* (HASLER, 2014).

As condições de maturação utilizadas pela grande maioria dos laboratórios envolvem o uso de TCM199[®] suplementado com 10% de soro fetal de bovino (SFB) e gonadotrofinas (FSH, LH) em 5% de CO₂ em ar a 38,5 °C. Após 20 a 24 horas de incubação dos oócitos ocorre a maturação completa com a extrusão do primeiro corpúsculo polar, quando o oócito está pronto para ser fecundado (DEB *et al.*, 2016).

2.1.3 Fecundação *in vitro* dos oócitos

A FIV consiste em realizar a união dos gametas masculino e feminino, em um ambiente laboratorial controlado e adequado para permitir o metabolismo de oócitos e as células que o envolvem, células do *cumulus* (CC), e manter a função espermática com o objetivo de produzir embriões em larga escala e a baixo custo (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). O sêmen congelado-descongelado é bastante usado para FIV e o sistema de seleção baseado no gradiente de Percoll é o método mais comum para isolar a fração com espermatozoides móveis após a descongelação. Embora outros sistemas possam ser usados, como a centrifugação simples, a separação através de um gradiente de Percoll oferece a consistência, flexibilidade e confiabilidade que são necessários à PIVE bovina (HASLER; BARFIELD, 2015).

Dois meios são geralmente utilizados para FIV: Tyrode's-albumina-lactato-piruvato (TALP) ou fluido sintético de oviduto (SOF), ambos sem glicose e com diferentes concentrações de heparina. Após a FIV, os oócitos são completamente desnudados das CC remanescentes e separados dos espermatozoides, por pipetagem contínua ou vortex, e são transferidos para um sistema de cultivo adequado para o desenvolvimento do embrião (HASLER; BARFIELD, 2015). Entre os fatores que afetam o desempenho da FIV, o doador de sêmen possui um papel importante. Alguns machos têm uma menor qualidade de espermatozoides, o que pode prejudicar a FIV e comprometer o desenvolvimento embrionário (ABRAHAM *et al.*, 2012).

2.1.4 Cultivo *in vitro* dos presumíveis zigotos

A etapa de CIV ocorre a partir de oócitos fecundados até o estágio de blastocisto, fornecendo condições favoráveis, tais como, nutrientes, temperatura, pH e umidade adequados, para que os presumíveis zigotos desenvolvam com qualidade. Vários protocolos têm sido desenvolvidos e aplicados para o CIV. Estes incluem o co-cultivo e sistemas isentos de células (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Há quase 30 anos, o sucesso inicial foi obtido com o uso de co-cultivo com células do oviduto (EYESTONE; FIRST, 1989). No entanto, este sistema requer uma administração cuidadosa das células do oviduto que são muito sensíveis às variações biológicas. Portanto, essa técnica não possui um uso prático para PIVE em grande escala (MAILLO *et al.*, 2016).

Posteriormente, a utilização de meios semi-definidos, com soro em baixa quantidade ou ausente e com baixa tensão de oxigênio, substituiu quase totalmente a utilização de co-cultivo. Os meios SOF-BSA (albumina sérica bovina) e Charles Rosenkrans 1 e 2 (CR1 e CR2) são exemplos utilizados com bastante frequência (ROSENKRANS *et al.*, 1993; KRISHER; LANE; BAVISTER, 1999). Estes meios podem ser suplementados com aminoácidos (REZAEI; CHIAN, 2005), além de glutatona, superóxido-dismutase ou taurina, cisteamina e β -mercaptoetanol como antioxidantes, agentes quelantes, como EDTA (OLSON; SEIDEL JR, 2000), fatores de crescimento para melhorar o desenvolvimento dos blastocistos e taxa de implantação, e outras moléculas, tais como hialuronano (BLOCK; HANSEN, 2007; BLOCK *et al.*, 2011).

O acúmulo de metabólitos no embrião durante os sistemas de CIV pode explicar a baixa qualidade de embriões bovinos. Portanto, a renovação de meios de cultivo 72 horas pós FIV foi sugerida a fim de atender a natureza dinâmica do metabolismo do embrião nas etapas de clivagem iniciais (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW *et al.*, 2000).

Enquanto a qualidade intrínseca do oócito constitui o principal determinante da taxa de blastocistos, o ambiente de cultivo pós-FIV tem a maior influência sobre a qualidade de blastocisto (KRISHER, 2004). Os embriões são suscetíveis a uma ampla gama de situações que causam estresse incluindo formulações inadequadas de meios de cultivo, problemas técnicos ou no sistema de cultivo, ou falta de controle de qualidade (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW *et al.*, 2000). Estes fatores de estresse podem desencadear mecanismos de respostas destinados a preservar o equilíbrio homeostático no embrião. As respostas em curto prazo incluem alterações na morfologia (ABE;

HOSHI, 2003), na proliferação celular e apoptose (KNIJN *et al.*, 2002), no metabolismo (THOMPSON, 2000), transcriptoma (FABIAN; KOPPEL; MADDOX-HYTTEL, 2005) e proteoma (KATZ-JAFFE *et al.*, 2005).

2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ESTRESSE OXIDATIVO

As EROs são moléculas formadas durante as etapas intermediárias de redução de oxigênio, incluindo o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), que correspondem à redução de um, dois e três elétrons, respectivamente (GUÉRIN; EL MOUATASSIM; MENEZO, 2001). As EROs incluem todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio, os quais são eletronicamente instáveis e, por isso, altamente reativos. Por esse motivos, estas moléculas possuem a capacidade de reagir com um grande número de compostos que estejam próximos. Além disso, elas podem exercer a função de agentes oxidantes, atuando como receptores de elétrons, ou de agentes redutores, atuando como doadores de elétrons (ANDRADE *et al.*, 2010).

A formação de EROs em vários processos metabólicos exerce um papel importante no funcionamento do organismo. Quando em concentrações fisiológicas, são responsáveis pelo transporte de elétrons na cadeia respiratória, atuando como moléculas sinalizadoras (AL-GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010). Estas moléculas participam de diversos processos relacionados com a fisiologia ovariana e gametogênese, incluindo a maturação oocitária, esteroidogênese e função do corpo lúteo, bem como espermatogênese e fecundação (TSUNODA; KIMURA; FUJII, 2014).

As EROs podem reagir com ácidos nucleicos, lipídios, proteínas e carboidratos para adquirir um elétron e tornar-se estável. Essas reações induzem uma cascata de reações em cadeia subsequentes que eventualmente resultam em dano celular (AL-GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010). As EROs podem difundir e passar por membranas celulares e alterar a maioria dos tipos de moléculas celulares como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, levando a alterações mitocondriais (FIGUEIRA *et al.*, 2013), parada meiótica nos oócitos (PANDEY *et al.*, 2010), bloqueio embrionário e morte celular (CIRCU & AW, 2010).

Em condições fisiológicas, os mecanismos endógenos protetores relacionados com a produção de EROs e os mecanismos celulares antioxidantes encontram-se em uma situação de equilíbrio. Quando este equilíbrio é quebrado ocorre o estresse

oxidativo (AL-GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010). Esta proporção pode mudar com níveis aumentados de EROs ou uma diminuição nos mecanismos de defesa antioxidante que controlam a coleta de EROs, não-radicais (ozônio, oxigênio único, lipídios peróxidos, peróxido de hidrogênio) e derivados de oxigênio (LAMPÍAO *et al.*, 2012). Desta forma, o estresse oxidativo ocorre quando o aumento dos níveis de EROs, que participam do balanço celular de redução e oxidação (REDOX), resulta em distúrbios dos processos celulares e/ou danifica as macromoléculas celulares, podendo causar parada no desenvolvimento e apoptose celular (DEVINE; PERREAULT; LUDERER, 2012; GAD *et al.*, 2012).

Na reprodução, o estresse oxidativo pode provocar efeitos deletérios tanto ao sistema reprodutor feminino como ao masculino. No que diz respeito às fêmeas, os problemas podem ocorrer desde o processo de maturação do oócito até à gestação, e nos machos os distúrbios podem ocorrer durante as várias etapas da espermatogênese. O estresse oxidativo também pode ocasionar lesões ao DNA das células da linha germinativa de ambos os sexos, e se tal processo não for contido, os descendentes do indivíduo em questão poderão apresentar defeitos de diversas ordens (ANDRADE *et al.*, 2010).

O equilíbrio entre a produção de EROs e os mecanismos endógenos antioxidantes é um importante fator para a aquisição da habilidade de fecundação nos sistemas *in vitro*, sendo necessário para otimizar a interação entre oócito e espermatozoide (TSUNODA; KIMURA; FUJII, 2014). Além disso, o radical hidroperóxido (HO₂), um ácido conjugado do radical superóxido, desempenha um papel fundamental na ativação da cascata da peroxidação lipídica nas membranas celulares (GUÉRIN; EL MOUATASSIM; MENEZO, 2001).

Verificou-se que concentração intracelular de EROs aumenta em sistemas *in vitro*. Elevadas quantidades de EROs foram detectadas nos estádios iniciais de clivagem em embriões bovinos produzidos *in vitro* (LOPES; LANE; THOMPSON *et al.*, 2010), podendo relacionar-se com a diminuição de eficiência da produção e qualidade dos embriões produzidos (ANDRADE *et al.*, 2010). Além disso, embriões produzidos e cultivados *in vitro* são mais susceptíveis aos danos oxidativos, visto que seus mecanismos de defesa são insuficientes para proteger sua delicada estrutura celular (TAKAHASHI, 2012).

2.2.1 Tensão de oxigênio na produção *in vitro* de embriões

Stephoe, Edwards & Purdy (1971) relataram o primeiro cultivo com sucesso de embriões humanos até o estágio de blastocisto. Neste relato, os autores descreveram as condições de cultivo que propiciaram este avanço. Mais especificamente, eles observaram que a tensão de O_2 no sistema não utilizava o O_2 atmosférico, o qual é em torno de 21%. Na realidade os autores utilizaram um sistema de três gases consistindo de 5% O_2 , 5% CO_2 e 90% N_2 . No entanto, por várias décadas, a maior parte das clínicas e institutos de embriologia realizou o cultivo de embriões em O_2 atmosférico. A razão mais plausível para esta decisão é o custo financeiro associado com a redução de O_2 no sistema, o que requer incubadoras especializadas que possuam sensores deste gás.

Nos estudos sobre a PIVE de diversas espécies, inclusive bovinos, o estresse oxidativo induzido pela elevada tensão de O_2 tem recebido atenção nos últimos anos, pois a tensão de O_2 é diferente entre os ambientes *in vivo* e *in vitro*. A maioria dos sistemas de CIV usam 5% de CO_2 no ar, o que significa que a tensão de O_2 é de aproximadamente 20%. Este valor é mais elevado do que o encontrado no oviduto e no útero da maioria dos mamíferos, o que é geralmente de 1,5 a 8,5% (BANWELL *et al.*, 2007).

O CIV de embriões de mamíferos mostrou um aumento significativo na competência ao desenvolvimento desses embriões quando a tensão de O_2 foi reduzida de 20 para 5% (FAVETTA *et al.*, 2007). Estes resultados sugerem que uma tensão de O_2 mais elevada durante o CIV é deletéria ao desenvolvimento embrionário devido ao acúmulo de EROs (GAD *et al.*, 2012).

Uma mudança na tensão de O_2 em torno do momento de compactação adapta-se a uma mudança geral na estratégia metabólica do embrião durante esta transição. Antes da compactação, os embriões produzem energia via fosforilação oxidativa (LEESE, 1995). Não há crescimento evidente dos embriões durante esta fase e muito pouco consumo de oxigênio ou atividade biossintética. No entanto, durante a compactação, o consumo de O_2 aumenta significativamente e a glicose torna-se o substrato energético primário e a energia é produzida principalmente através da glicólise aeróbia (Figura 1). Uma diminuição na exposição ao O_2 durante esta fase pode proteger contra um excesso de estresse oxidativo (GUÉRIN; EL MOUATASSIM; MENEZO, 2001).

Figura 1- Estratégia metabólica do embrião pré-implantacional. A alteração na tensão de O₂ deve ser consistente com a mudança na estratégia metabólica do embrião no momento da ativação do genoma embrionário.



Fonte: elaborada pela autora

2.3 SISTEMAS PORTÁTEIS PARA A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Incubadoras e meios de cultivo são os componentes centrais de um laboratório de PIVE, sendo que, nos últimos 20 anos os meios de cultivo evoluíram bastante, indo de simples soluções salinas até complexos meios sequenciais utilizados em clínicas de reprodução humana (POOL, 2004). Por outro lado, as incubadoras, parte igualmente importante no sistema de cultivo, tiveram relativamente pouca evolução durante o mesmo período. As incubadoras utilizadas em muitos laboratórios de PIVE têm um volume de câmara interior de aproximadamente 180 L e foram originalmente projetadas para o cultivo de células somáticas em grande escala (Figura 2A).

Os sistemas de grande volume foram adaptados e equipados com umidificação para minimizar as alterações de evaporação e osmolaridade dos meios de cultivo. Estas incubadoras (ex: Thermo-Forma, Thermo Fisher Sci., EUA) mantêm temperatura e tensão de CO₂ fechadas. No entanto, com o advento do cultivo sequencial, são necessárias observações frequentes dos oócitos e embriões, fazendo com que a incubadora seja aberta várias vezes. Assim, o interior é rapidamente desumidificado e a concentração de CO₂ diminui. Uma vez fechada a porta, a incubadora injeta CO₂ para que possam ser restauradas as condições anteriores (LEE; GRAZI; SEIFER, 2013).

Por outro lado, existe atualmente uma tendência mundial nos laboratórios de reprodução assistida em humanos o uso de mini-incubadoras (ex: K MINC, Cook,

Austrália) nas quais a tensão final de CO₂ não é regulada pela incubadora, mas pré-misturada no cilindro da empresa de fornecimento de gás (Figura 2B). A umidade relativa da câmara que é fechada por um período mínimo de 6 h gira em torno de 75 a 80% e o pequeno volume da câmara permite uma recuperação rápida das condições iniciais de cultivo (LEE; GRAZI; SEIFER, 2013).

Figura 2 - Modelos de incubadoras utilizadas no cultivo *in vitro* de embriões bovinos. A: modelo convencional com grande volume. B: modelo mini de bancada utilizando mistura de gases.



Fonte: elaborada pela autora

3 JUSTIFICATIVA

O crescimento da PIVE no Brasil permitiu sua aplicação em larga escala e a exportação desta técnica para vários países latino-americanos e de outros continentes (VIANA *et al.*, 2012). Embora tenham sido realizados progressos substanciais nos processos de MIV, FIV e CIV em bovinos, a porcentagem de embriões produzidos *in vitro* que são normalmente capazes de desenvolver-se é ainda baixa, comparada com embriões produzidos *in vivo* (LONERGAN *et al.*, 2003). Assim, existe uma constante busca de alternativas metodológicas que possam aumentar a taxa de produção de blastocistos a serem transferidos imediatamente ou criopreservados para posterior transferência para receptoras previamente preparadas.

Efeitos prejudiciais no desenvolvimento embrionário devido o estresse oxidativo causados pela alta concentração de oxigênio durante o cultivo têm sido estudados em comparação com as condições *in vivo* de concentração de oxigênio. Sabe-se que a proteção do embrião contra o estresse oxidativo parece ser uma das chaves para melhorar a qualidade da PIVE (TAKAHASHI, 2012). Portanto, proteger o oócito e o embrião contra o estresse oxidativo, durante todas as etapas da PIVE, parece ser uma das chaves para melhorar o desenvolvimento do embrião *in vitro*.

Adicionalmente, a grande extensão territorial brasileira e a distância entre as propriedades onde estão localizados as doadoras de oócitos e os laboratórios tem limitado a expansão da PIVE comercial, principalmente pelas condições e pelo tempo gasto durante o transporte dos oócitos e/ou embriões. Tais fatores podem influenciar a taxa e a qualidade de blastocistos ao final do processo (MARINHO *et al.*, 2012).

Alternativas de transporte têm sido fabricadas e estudadas em diferentes espécies, como o uso de mini-incubadoras portáteis capazes de simular o ambiente do laboratório. Estes equipamentos prometem realizar tanto a maturação de oócitos, quanto o cultivo de embriões enquanto são transportados, possibilitando uma melhor execução de todo o processo da PIVE sem nenhuma interrupção até o momento de transferência para as receptoras (BYRD *et al.*, 1997; DONG *et al.*, 2001; LOIOLA *et al.*, 2014).

4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- O uso de um sistema de incubação portátil com baixa tensão de oxigênio, garante a manutenção da eficiência da produtividade de embriões produzidos *in vitro*, quando comparado ao sistema tradicional.

5 OBJETIVOS

5.1 GERAL

Verificar a eficiência de três diferentes sistemas de incubação (incubadora de bancada convencional com oxigênio elevado, mini-incubadora de bancada e mini-incubadora portátil ambas com baixa tensão de oxigênio) sobre a produção quantitativa de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

5.2 ESPECÍFICOS

- a) Determinar a taxa de maturação de oócitos bovinos submetidos a três diferentes sistemas de incubação.
- b) Verificar, na espécie bovina, a taxa de clivagem e de produção de blastocistos em três diferentes sistemas de incubação.
- c) Determinar a qualidade dos blastocistos bovinos produzidos *in vitro* através da contagem do número de blastômeros.
- d) Verificar a produção de EROs em oócitos pós-maturação, embriões clivados (dia 2 de cultivo) e blastocistos (dia 7 de cultivo) quando submetidos às condições de três diferentes sistemas de incubação.

6 CAPÍTULO 1

Efficiency of different incubation systems for the *in vitro* production of bovine embryos

Eficiência de diferentes sistemas de incubação para a produção *in vitro* de embriões bovinos

Submetido para o periódico: Livestock Science.

Qualis B1, Fator de impacto 1,377

Efficiency of different incubation systems for the *in vitro* production of bovine embryos

Camila M. Cavalcanti, Iana S. Campelo, Mirelly M.A.S. Silva, João V.S. Albuquerque, Luciana M. Melo, Vicente J.F. Freitas*

Laboratory of Physiology and Control of Reproduction, Faculty of Veterinary, State University of Ceará (UECE), Av. Dr. Silas Munguba, 1700, 60714-903, Fortaleza-CE, Brazil

*Corresponding author. E-mail address: vicente.freitas@uece.br

ABSTRACT

This study aimed to compare the efficiency of three incubation systems on the quantitative *in vitro* embryo production in bovine. In addition, reactive oxygen species (ROS) levels were evaluated in matured oocytes, cleaved embryos and blastocysts. Oocytes were randomly distributed into three incubators: conventional - CONV (high O₂ tension), mini bench - MINI (low O₂ tension) and portable - PORT (low O₂ tension) for *in vitro* maturation (IVM). After IVM, oocyte samples were chosen at random to determine the maturation rate using Hoechst 33342 staining. The remaining structures were subjected to *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* culture (IVC) in each incubation system for posterior cleavage evaluation (day 2) and blastocyst (day 7-8) rates. Post-IVM oocytes and embryos (at day 2 and day 7) were stained with H₂DCFDA for the ROS levels assessment by software image analysis and arbitrary fluorescence units determination (AFUs). No significant difference ($p > 0.05$) was observed for

maturation rate (70.4%, 50.8% and 57.6% for CONV, MINI and PORT, respectively). Concerning the cleavage rate, CONV (74.0%) produced the highest percentage ($p < 0.05$) when compared to PORT (59.5%), but similar ($p > 0.05$) to MINI (65.0%). The same pattern and significant difference were observed for blastocyst rate at day 7: CONV (33.3%), MINI (32.3%) and PORT (21.9%) groups. Regarding the ROS levels (AFUs mean $\pm$ SEM), post-IVM oocytes showed no significant difference ($p > 0.05$) when compared CONV (35.6 ± 4.5), MINI (29.4 ± 4.0) and PORT (35.6 ± 4.5) groups. For day-2 embryos, the ROS levels were higher ($p < 0.05$) in the MINI group (44.2 ± 3.1) in comparison to CONV (27.7 ± 3.7) and PORT (33.3 ± 3.2). However, no significant difference ($p > 0.05$) was observed in day-7 embryos: 45.0 ± 3.5 , 48.1 ± 3.9 and 43.3 ± 3.3 for CONV, MINI and PORT, respectively. In conclusion, the PORT system was able to obtain IVP embryos in spite of not being as efficient as the CONV system. In addition, although it produced a high ROS level at day 2 of culture, MINI was as efficient as the CONV system for blastocyst production. This may be a more economical option for the *in vitro* produced bovine embryo industry.

Keywords: Incubator, oxygen tension, ROS

1. Introduction

Brazil is the worldwide leader in the *in vitro* production (IVP) of bovine embryos, since 2013, approximately 70% of them has been obtained in this country (IETS, 2015). The use of IVP in Brazil is unique, with a strong impetus for replacing multiple ovulation and embryo transfer (MOET) by *ovum pick-up* (OPU)/IVP (Pontes et al., 2010). One of the main reasons for this condition is that *Bos indicus* (zebu) cattle, the largest herd in the country, has more ovarian follicles and more oocytes recovered by OPU than *Bos taurus* cattle (Pontes et al., 2009). In this system, one of the greatest challenges is to

overcome geographical distance between oocyte donor farms and IVP laboratories, because the conditions during oocytes transport influence both rate and quality of blastocysts at the end of the process (Marinho et al., 2012). In this sense, the use of a system, partially or fully portable, for *in vitro* maturation (IVM), fertilization (IVF) and culture (IVC) would be highly beneficial to the IVP bovine embryo industry.

Although the IVP of bovine embryos has developed considerably in recent decades, embryos are still susceptible to a wide range of stressful situations, including inadequate culture media and culture conditions, such as pH (Lane, 2001), temperature (Sugiyama et al., 2007) and oxygen tension (Corrêa et al., 2008). The oxygen tension most frequently used in IVP systems is often higher (20% O₂) than that found in the female reproductive tract (3-9% O₂) and it is believed that this high tension induces excessive generation of reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical and peroxy radical, which can cause deleterious effects on the embryo development (Thompson et al., 1990; Martín-Romero et al., 2008). Additionally, beneficial effects of low oxygen concentration on *in vitro* developmental competence of oocytes have been reported in cattle (Yuan et al., 2003), mouse (Rinaudo et al., 2006) and humans (Ciray et al., 2009).

Thus, the aim of this study was to evaluate the quanti-qualitative production of IVP bovine embryos under three incubation systems: conventional bench (high O₂ tension), mini bench (low O₂ tension) and portable (low O₂ tension). In addition, for each incubation system, ROS levels were evaluated in the different stages: post-IVM oocytes, cleaved embryos (day 2) and blastocysts (day 7).

2. Material and methods

2.1. Chemicals

All chemicals used in this study were purchased from Sigma-Aldrich Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA) unless otherwise indicated.

2.2 Ethics and experimental design

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the State University of Ceará (CEUA, n° 4024452-2017). Bovine oocytes/embryos were subjected to IVM, IVF and IVC in three experimental groups or incubators: conventional bench - CONV (Thermo-Forma, Thermo Fischer, Waltham, MA, USA) with high oxygen tension (5% CO₂, 20% O₂ in air), mini bench - MINI (Eve, WTA, Cravinhos, Brazil) with low oxygen tension (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂) and portable - PORT (LabMix, WTA) also with low oxygen tension.

2.3 Oocyte collection and IVM

Ovaries obtained at local slaughterhouse were transported to the laboratory in a thermos box containing saline solution (NaCl 0.9% w/v) at 34 °C. Ovaries were washed in pre-warmed fresh saline and *cumulus*-oocyte complexes (COCs) from follicles of 2-8 mm were aspirated with an 18-gauge needle connected to a syringe. COCs were selected under a stereomicroscope (SMZ800, Nikon Co., Tokyo, Japan) and only COCs enclosed in three compact layers of *cumulus* cells and homogeneous cytoplasm were selected. For IVM, COCs were washed in HEPES-buffered TCM-199 (H-TCM) medium and distributed into groups of 50 COCs in wells containing 500 µl of maturation medium which consisted of TCM-199 supplemented with 10% (v/v) FBS (Gibco, Grand Island, NY, USA), 20 µg/ml FSH and LH (Pluset; Hertape-Calier, Spain), 0.2 mM sodium pyruvate, 0.1 mM cysteamine, 1x antibiotic antimycotic, 10 ng/ml epidermal growth

factor (EGF), 1 µg/ml estradiol and 1 mM L-glutamine under mineral oil. COCs were incubated at 38.5 °C for 22 h in each experimental group (incubator).

2.4 Nuclear maturation

For nuclear maturation analysis, oocytes of each experimental group were denuded, washed in PBS supplemented with 0.4% BSA and stained with 10 µM Hoechst 33342 in PBS/BSA for 15 min at room temperature. The stained oocytes were washed in PBS/BSA and mounted with glycerol between a slide and coverslip and observed by optical microscopy (Eclipse E400, Nikon) equipped with UV-2E/C filter (330-380 nm). Oocytes were classified for nuclear configuration in germinal vesicle, metaphase I and metaphase II to obtain the maturation rate (MII oocytes) for each experimental group.

2.5 IVF and IVC

Frozen semen was thawed in a water bath at 37 °C for 25 s. Sperm was then centrifuged three times (700×*g* for 25 min, 500×*g* for 10 min and 400×*g* for 10 min) in a BO medium (Brackett and Oliphant, 1975) supplemented with 5 mM caffeine and 20 IU/ml heparin (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Sperm was diluted with BO medium containing 20 mg/ml BSA to achieve concentration of 20×10^6 spermatozoa/ml. Matured COCs were washed with H-TCM and incubated in 100 µl droplets of sperm suspension covered with mineral oil at 38.5 °C in each incubator. After 6 h of incubation, presumptive zygotes were denuded by vortexing, washed in H-TCM and transferred for wells containing 500 µl synthetic oviduct fluid (SOF) covered with mineral oil. Embryos were cultured for eight days at 38.5 °C in each incubator. On day two (D2), seven (D7) and eight (D8) after IVF, the percentage of cleaved, blastocyst and hatching, were evaluated, respectively. Similarly to that performed for nuclear

maturation, expanded blastocysts were stained (Hoechst 33342) and the total number of cells counted.

2.6 Assessment of ROS levels

From each experimental group, samples of post-IVM oocytes and embryos (D2 and D7) were evaluated for concentration of ROS using the fluorescent probe 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA). Oocytes/embryos were incubated for 30 min in 10 μ M H₂DCFDA dissolved in DMSO in 50 μ l droplet of PBS supplemented with 0.1% (w/v) polyvinyl alcohol (PBS/PVA) at 38.5°C in a dark, humidified and 5% CO₂ atmosphere (Yang et al., 1998; Wang et al., 2014). After incubation, structures were washed and placed into four-well cell culture plates containing 50 μ l PBS/PVA. Fluorescence emitted was captured using GFP filter (450-490 nm) two seconds after exposure to UV light fluorescence using inverted microscope (Eclipse TE2000, Nikon). The fluorescence intensities expressed were analyzed in arbitrary fluorescence units (AFUs) using the Infinity Analyze software (Lumenera Co., Ottawa, Canada).

2.7 Statistical analyses

Before analysis, data were tested for normality using Shapiro-Wilk test. Rates of matured oocytes, cleavage, expanded blastocysts, hatching and total cells numbers were evaluated by one-way ANOVA. ROS levels were analyzed by Kruskal-Wallis test. Analyses were performed using the GraphPad InStat 7.0 software, at the significance level of 5%.

3. Results

After IVM for 22 h, a total of 201 oocytes were assessed for nuclear maturation. Oocytes in metaphase I were observed in 12.3% (10/81), 14.8% (9/61) and 22.0% (13/59) for CONV, MINI and PORT groups, respectively. The majority of oocytes reached MII stage in all groups, with 70.4% (CONV), 50.8% (MINI) and 57.6% (PORT). There were no differences among treatments ($p > 0.05$).

Concerning the embryo production, the results obtained from 19 replicates are summarized in Table 1. After IVF, a total of 1889 presumptive zygotes were cultured in the different incubation systems. Concerning the cleavage rate, no significant difference was observed between CONV and MINI groups (74.0 vs 65.0 %, $p > 0.05$). However, the CONV group was superior to PORT (74.0 vs 59.5%, $p < 0.05$). Regarding the blastocyst rate, both on D7 and D8, the same pattern was observed. Finally, regarding the hatching rate, MINI and PORT groups had the highest values (50.0 vs 46.0, $p > 0.05$). The number of cells per expanded blastocyst was verified and no significant difference ($p > 0.05$) was observed among the three experimental groups: 122.2 ± 29.1 (CONV), 145.9 ± 57.1 (MINI) and 99.0 ± 49.5 (PORT).

Randomly selected from each experimental group, 130 post-IVM oocytes, 148 cleaved embryos (D2) and 128 blastocysts (D7) were stained and the fluorescence emitted was verified and expressed in AFUs. The main effects of the incubation system on the intracellular ROS content are demonstrated in Fig. 1 and 2. Regarding the post-IVM oocytes, no significant difference ($p > 0.05$) was observed among the experimental groups, which showed values varying between 29.4 and 37.6 AFUs. Concerning the ROS levels in D2 embryos, a significant difference was observed ($p < 0.05$) between MINI group (44.2 ± 3.1) in comparison to CONV (27.7 ± 3.7) and PORT (33.3 ± 3.2) groups. Finally, for blastocysts, no statistical difference ($p > 0.05$) was observed; but, at this embryonic development stage, the highest mean values of ROS levels were

verified, varying between 43.3 to 48.1 AFUs (Fig. 1). This finding is also subjectively confirmed when observing the blastocysts fluorescence images captured at D7 of culture (Fig. 2).

Table 1 Effect of incubation system (conventional-CONV, mini bench-MINI and portable-PORT) on development of *in vitro* produced bovine embryos.

Groups	Presumptive zygotes	Cleavage rate	Blastocyst rate at		Hatching rate
			D7	D8	
CONV	731	74.0 ± 11.2 ^a	33.3 ± 11.5 ^a	34.3 ± 10.5 ^a	29.8 ± 18.1 ^a
MINI	629	65.0 ± 16.2 ^{ab}	32.3 ± 13.7 ^{ab}	32.9 ± 13.9 ^{ab}	59.9 ± 22.4 ^b
PORT	529	59.5 ± 16.5 ^b	21.9 ± 8.3 ^b	24.0 ± 10.4 ^b	46.0 ± 18.5 ^{ab}

Different superscript letters within same column denote statistical difference ($p < 0.05$) between groups. Data are presented as mean percentage ± SD. Cleavage and blastocyst rates were calculated from the total presumptive zygotes. Hatching rate was calculated from the number of blastocysts at D8.

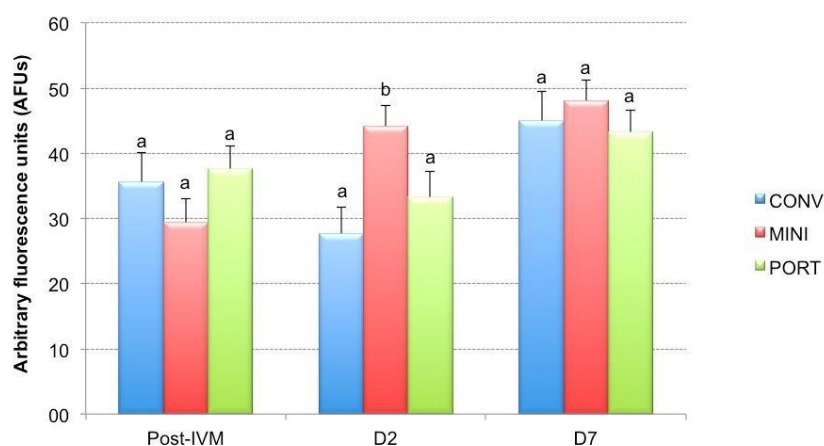


Fig. 1. ROS levels (mean ± SEM) in post-IVM oocytes and embryos (at D2 and D7) cultured in different incubation systems (conventional-CONV, mini bench-MINI and portable-PORT) and stained with H₂DCFDA. Different letters denote statistical difference ($p < 0.05$).

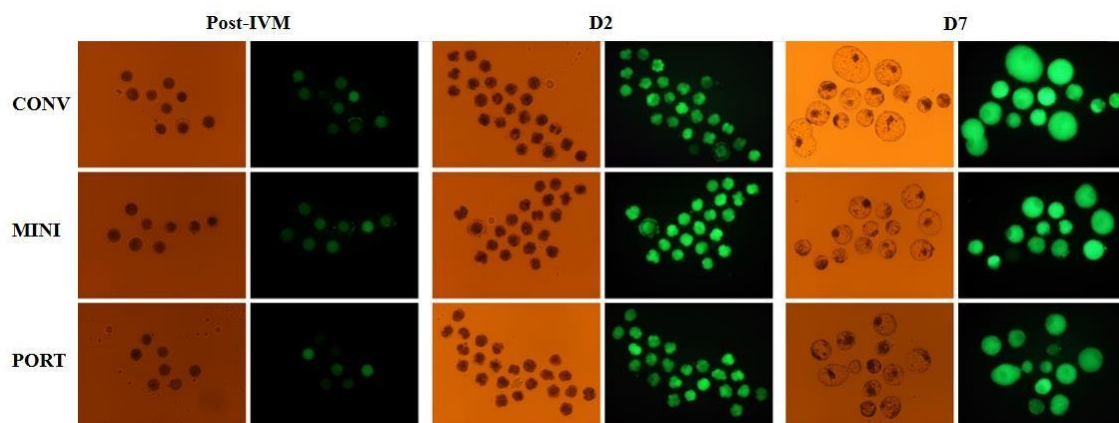


Fig. 2. Representative images ($\times 100$) of post-IVM oocytes and embryos (at D2 and D7) cultured in different incubation systems (conventional-CONV, mini bench-MINI and portable-PORT) and stained with H_2DCFDA . Bright field (left column) and fluorescence (right column) are showed for each developmental stage. The green fluorescence indicates arbitrary fluorescence units of ROS levels.

4. Discussion

This study sought to find solutions to two specific needs of the IVP bovine embryos industry. Firstly, due to great distances between oocyte donor farms and laboratories, to propose a totally portable incubation system to carry out the several steps of IVP (IVM, IVF and IVC). Secondly, to verify the efficiency of these different steps when the structures (oocytes/embryos) are subjected to incubation systems with low or high oxygen tension. The supraphysiological concentration (high oxygen tension) has been associated with increased concentrations of ROS, which alters the culture environment, thus hindering the embryo development (Fatehi et al., 2005). Therefore, ROS levels were verified during the several steps and for each incubation system.

In embryo culture, the high volume in conventional culture incubators were adapted and equipped with humidification to minimize both evaporative changes and osmolarity of

culture media. On the other hand, there is currently a worldwide trend in human-assisted reproduction laboratories to use mini-incubators in which the final CO₂ tension is not regulated by the incubator but premixed in the gas supply company cylinder.

In these pieces of equipment, the small chamber volume allows a rapid recovery of the initial culture conditions and, consequently, an economy in the gas mixture (Lee et al., 2013).

The results obtained in the present study indicated that the nuclear oocytes maturation was not affected by the incubation system. In our study, the maturation rate varied between 50.8 and 70.4%, which was lower than the rates verified in other studies with bovine oocytes, which describe rates between 80 and 90% (Diógenes et al., 2017). However, our results are consistent with previous studies, in which it was observed that there was no difference in IVM rate of bovine oocytes produced under 20% and 5% of oxygen tension (Pereira et al., 2010; Mingoti et al., 2011).

Oocytes transportation in incubators with an uncontrolled gaseous atmospheric tension can lead to alterations in the pH of the transport medium and increased oxidases activity, thus culminating in increased ROS production (Guemra et al., 2014). Apparently, the portable incubation system used in our study (with a controlled gaseous atmospheric tension) was efficient in avoiding these deleterious effects, because the oocyte maturation rate and ROS levels were similar to the other groups. Ambrogi et al (2017) also avoided these negative effects when the transport-maturation medium was supplemented with an antioxidant mixture.

Except for the hatching rate, all other parameters of embryo production, ie, cleavage (D2) and blastocyst (D7-D8) rates, were lower in the PORT group. These results suggest that the action of PORT system had on oocyte maturation was not enough for a longer culture period (seven to eight days). On the other hand, the CONV and MINI

systems presented the same efficiency for several parameters. The effects of *in vitro* oxygen tension on embryonic development are still controversial. Although oxygen concentration in the mammals' oviduct varies between 2% and 9% (Fischer and Bavister, 1993), several studies find success culturing at 20% (Thompson et al., 1990; Oliveira et al., 2013). Studies find increased development when embryos are cultured in high oxygen (20%) tension (Mingoti et al., 2011). In addition, the combination of oxygen tension and FBS supplementation plays a major role in the lipid profile of bovine embryos (Ferreira et al., 2010).

In our study, the ROS levels were assessed in post-IVM oocytes, cleaved embryos and blastocysts. Only for the cleaved embryos an effect was observed of the incubation system. At this stage, the embryos cultured in the MINI system had the ROS highest levels. Studies have implicated ROS in many aspects of cell growth and development, not only in cell death/senescence and are found in equilibrium in cells under normal physiological conditions. Low ROS concentrations are capable of mediating cellular functions through intracellular signaling steps activated by various stimuli (Khazaei, and Aghaz, 2017). The cells redox balance appears to be an important part of the development, such that non-toxic ROS concentrations, via alterations in redox balance, are considered to be a mechanism that regulates several cell functions, particularly in the preimplantation embryo (Harvey et al., 2002). Under special conditions, such as embryos' IVP, ROS production increases and results in decreased *in vitro* embryos' development (Guerin et al., 2001). However, the highest levels of ROS observed in D2 embryos cultured in the MINI system did not cause negative effects on the later development of these embryos until the blastocyst stage.

Finally, portable or semi-portable systems have some advantages in comparison to expensive incubators and gas mixtures for IVM, IVF and IVC. Under field conditions

and as a method for gamete transportation under controlled gas atmospheres these systems may thus be a valuable and low-cost alternative to conventional systems (Avery et al., 2000).

5. Conclusion

Under our experimental condition, it was possible to conclude that: i) the fully portable incubation system (PORT) was able to obtain IVP embryos, but not as efficient as CONV system and ii) although it produced a high ROS level on D2 of culture, the intermediate system (MINI) was as efficient as the CONV system of incubation for the blastocyst production. This may be a more economical option for the *in vitro* produced bovine embryo industry.

Conflict of interest statement

The authors declare they have no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, Brazil) for providing the scholarship support and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP, Fortaleza, Brazil) for funding the research. V.J.F. Freitas is a senior CNPq investigator.

References

Avery, B., Melsted, J.K., Greve T. 2000. A novel approach for in vitro production of bovine embryos: use of the Oxoid atmosphere generating system. *Theriogenology* 54:1259-1268.

- Brackett, B.G., Oliphant G., 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 12, 260-274.
- Ciray, H.N., Aksoy, T., Yaramanci, K., Karayaka, I., Bahceci, M., 2009. In vitro culture under physiologic oxygen concentration improves blastocyst yield and quality: a prospective randomized survey on sibling oocytes. *Fertil. Steril.* 91, 1459-1461.
- Corrêa, G.A., Rumpf, R., Mundim, T.C.D., Franco, M.M., Dode, M.A.N., 2008. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Anim. Reprod. Sci.* 104, 132-142.
- Diógenes, M.N., Guimarães, A.L.S., Leme, L.O., Maurício, M.F., Dode, M.A.N., 2017. Effect of prematuration and maturation with fibroblast growth factor 10 (FGF10) on in vitro development of bovine oocytes. *Theriogenology* 102:190-198.
- Fatehi, A.N., Roelen, B.A., Colenbrander, B., Schoevers, E.J., Gadella, B.M., Beverst, M.M., van den Hurk, R., 2005. Presence of cumulus cells during in vitro fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. *Zygote* 13, 177-185.
- Ferreira, C.R., Saraiva, S.A., Catharino, R.R., Garcia, J.S., Gozzo, F.C., Sanvido, G.B., Santos, L.F., Lo Turco, E.G., Pontes, J.H., Basso, A.C., Bertolla, R.P., Sartori, R., Guardieiro, M.M., Perecin, F., Meirelles, F.V., Sangalli, J.R., Eberlin, M.N., 2010. Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 51:1218-1227.
- Fischer, B., Bavister, B.D., 1993. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J. Reprod. Fertil.* 99:673-679.
- Guemra, S., Santo, E.S., Zanin, R., Monzani, P.S., Sovernigo, T.C., Ohashi, O.M., Verde Leal, C.L., Adona, P.R., 2014. Effect of temporary meiosis block during

- prematuration of bovine cumulus-oocyte complexes on pregnancy rates in a commercial setting for in vitro embryo production. *Theriogenology* 81:982-987.
- Guérin, P., El Mouatassim, S., Menezo, Y., 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update* 7, 175-189.
- Harvey, A.J., Kind, K.L., Thompson, J.G., 2002. REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction* 123, 479-486.
- IETS, The International Embryo Transfer Society, 2015. Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals.
- Khazaei, M., Aghaz, F., 2017. Reactive oxygen species generation and use of antioxidants during in vitro maturation of oocytes. *Int. J. Fertil. Steril.* 11, 63-69.
- Lane, M., 2001. Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress in vitro. *Theriogenology* 55, 225-236.
- Lee, M., Grazi, R., Seifer, D., 2013. Incorporation of the K-Minc incubator and media system into the IVF lab: the future of IVF. *J. Clin. Embryol.* 13:21-32.
- Marinho, L.S.R., Untura, R.M., Morotti, F., Moino, L.L., Rigo, A.G., Sanches, B.V., Pontes, J.H.F., Seneda, M.M., 2012. Large-scale programs for recipients of in vitro-produced embryos. *Anim. Reprod.* 9, 323-328.
- Martín-Romero, F.J., Miguel-Lasobras, E.M., Domínguez-Arroyo, J.A., González-Carrera, E., Álvarez, I.S., 2008. Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 17, 652-661.
- Mingoti, G.Z., Castro, V.S.D.C., Méo, S.C., Barretto, L.S.S., Garcia, J.M., 2011. The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine in vitro procedures on kinetics of oocyte maturation and embryo development. *In Vitro Cel. Dev. Biol.-Animal* 47, 361-367.

- Oliveira, C.S., Saraiva, N.Z., Cruz, M.H., Mazeti, B., Oliveira, L.Z., Lopes, F.L., Garcia, J.M., 2013. HDAC inhibition decreases XIST expression on female IVP bovine blastocysts. *Reproduction* 145:9-17.
- Pereira, M.M., Machado, M.A., Costa, F.Q., Serapiao, R.V., Viana, J.H., Camargo, L.S., 2010. Effect of oxygen tension and serum during IVM on developmental competence of bovine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 1074-1082.
- Pontes, J.H.F., Nonato-Junior, I., Sanches, B.V., Ereno-Junior, J.C., Uvo, S., Barreiros, T.R.R., Oliveira, J.A., Hasler, J.F., Seneda, M.M., 2009. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* 71,690-697.
- Pontes, J.H., Melo-Sterza, F.A., Basso, A.C., Ferreira, C.R., Sanches, B.V., Rubin, K.C., Seneda, M.M., 2010. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 75, 1640-1646.
- Rinaudo, P.F., Giritharan, G., Talbi, S., Dobson, A.T., Schultz, R.M., 2006. Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos. *Fertil. Steril.* 86, 1252-1265.
- Sugiyama, S., McGowan, M., Phillips, N., Kafi, M., Young, M., 2007. Effects of increased ambient temperature during IVM and/or IVF on the in vitro development of bovine zygotes. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 271-274.
- Thompson, J.G.E., Simpson, A.C., Pugh, P.A., Donnelly, P.E., Tervit, H.R., 1990. Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J. Reprod. Fertil.* 89, 573-578.

Wang, F., Tian, X.Z., Zhang, L., He, C.J., Ji, P.Y., Li, Y., Tan, D.X., Liu, G.S., 2014.

Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 101, 577-586.

Yang, H.W., Hwang, K.J., Kwon, H.C., Kim, H.S., Choi, K.W., Oh, K.S., 1998.

Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum. Reprod.* 13, 998-1002.

Yuan, Y.Q., Van Soom, A., Coopman, F.O.J., Mintiens, K., Boerjan, M.L., Van Zeveren, A., de Kruif, A., Peelman, L.J., 2003. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology* 59, 1585-1596.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, é possível concluir que:

- a) A maturação de oócitos bovinos produzidos *in vitro* não é influenciada pelo pela tensão de oxigênio presente no sistema de incubação.
- b) A produção *in vitro* de blastocistos bovinos é prejudicada em um sistema de incubação portátil com baixa tensão de oxigênio, porém a qualidade dos blastocistos bovinos produzidos neste sistema não foi diminuída.
- c) Embora produza um alto nível de EROs no dia 2 de cultivo, o sistema de mini-incubadora de bancada é tão eficiente quanto o sistema de incubação convencional para a produção de blastocistos bovinos.

PERSPECTIVAS

Neste estudo foi verificada a possibilidade de utilização de uma incubadora portátil lançada no mercado, com baixa tensão de oxigênio, durante todas as etapas de produção *in vitro* de embriões bovinos. Os resultados obtidos neste sistema de incubação foram inferiores aos sistemas comumente utilizados, no que se refere a quantidade de blastocistos produzidos, embora não tenha sido observada diferença na quantidade de EROs. Assim, mais estudos avaliando a produção de EROs, durante os dias de cultivo *in vitro*, e a avaliação de outros parâmetros de qualidade de embrião (como, por exemplo, avaliação de apoptose e expressão gênica) são necessários.

Logicamente, para a indústria de PIVE em bovinos, as variáveis mais importantes a serem analisadas são o percentual de receptoras prenhes após a transferência de embriões bem como o número de crias nascidas. Portanto, uma etapa essencial na sequência desse estudo deverá ser a avaliação dos diferentes sistemas pelo uso de métodos *in vivo*, ou seja a PIVE seguida da transferência dos embriões obtidos para fêmeas receptoras previamente preparadas.

REFERÊNCIAS

- ABE, H.; HOSHI, H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. **Journal of Reproduction and Development**, v. 49, p. 193-202, 2003.
- AL-GUBORY, K.H.; FOWLER, P.A.; GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, p. 1634-1650, 2010.
- ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A.; Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 79-85, 2010.
- ABRAHAM, M.C.; GUSTAFSSON, H.; RUETE, A.; BRANDT, Y.C. Breed influences on *in vitro* development of abattoir-derived bovine oocytes. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, p. 36, 2012.
- BANWELL, K.M.; LANE, M.; RUSSELL, D.L.; KIND, K.L.; THOMPSON, J.G. Oxygen concentration during mouse oocyte *in vitro* maturation affects embryo and fetal development. **Human Reproduction**, v. 22, p. 2768-2775, 2007.
- BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artefacts. **Human Reproduction**, v.1, p. 91-148, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/acessoainformacao/estatistica>>. Acesso em: 07 dez. 2017.
- BLOCK, J.; HANSEN, P.J.; LOUREIRO, B.; BONILLA, L. Improving post-transfer survival of bovine embryos produced *in vitro*: actions of insulin-like growth factor-1, colony stimulating factor-2 and hyaluronan. **Theriogenology**, v. 76, p. 1602-1609, 2011.
- BLOCK, J.; HANSEN, P.J. Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-1 on survival of *in vitro*-produced embryos following transfer to lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 67, p. 1518-1529, 2007.
- BYRD, S.R.; FLORES-FOXWORTH, G.; APPLEWHITE, A.A.; WESTHUSIN, M.E. *In vitro* maturation of ovine oocytes in a portable incubator. **Theriogenology**, v. 47, p. 857-864, 1997.
- CIRCU, M.L.; AW, T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, p. 749-762, 2010.

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

DEB, G.K.; DEY, S.R.; NAHAR, T.N.; KHAN, M.Y.A.; RAHMAN, M.M. *In vitro* production of bovine blastocyst with oocyte collected from abattoir ovary. **Bangladesh Journal of Animal Science**, v. 1, p. 31-35, 2016.

DEVINE, P.J.; PERREAULT, S.D.; LUDERER, U. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. **Biology of Reproduction**, v. 86, p. 27-1, 2012.

DONG, Y.J.; VARISANGA, M.D.; MTANGO, N.R.; AONO, M.; OTOI, T.; SUZUKI, T. Improvement of the culture conditions for *in vitro* production of cattle embryos in a portable CO₂ incubator. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 313-318, 2001.

EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. **Journals of Reproduction and Fertility**, v. 85, p. 715-720, 1989.

FABIAN, D.; KOPPEL, J.; MADDOX-HYTTEL, P. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. **Theriogenology**, v. 64, p. 221–231, 2005.

FAVETTA, L.A.; ST JOHN, E.J.; KING, W.A.; BETTS, D.H. High levels of p66 shc and intracellular ROS in permanently arrested early embryos. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, p.1201-1210, 2007.

FERRAZ, M.L.; SÁ FILHO, M.F.D.; BATISTA, E.O.S.; WATANABE, Y.F.; WATANABE, M.R.; DAYAN, A.; JOAQUIM, D.C.; ACCORSI, M.R.; GIMENES, L.U.; VIEIRA, L.M.; BARUSELLI, P. S. Paradoxical effects of bovine somatotropin treatment on the ovarian follicular population and *in vitro* embryo production of lactating buffalo donors submitted to ovum pick-up. **Animal Reproduction Science**, v. 154, p. 1-7, 2015.

FIGUEIRA, T.R.; BARROS, M.H.; CAMARGO, A.A.; CASTILHO, R.F.; FERREIRA, J.C.B.; KOWALTOWSKI, A.J.; SLUSE, F.E.; SOUZA-PINTO, N.C.; VERCESI, A.E.; Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. **Antioxidants & Redox Ssignaling**, v. 18, p. 2029-2074, 2013.

GAD, A.; SCHELLANDER, K.; HOELKER, M.; TESFAYE, D. Transcriptome profile of early mammalian embryos in response to culture environment. **Animal Reproduction Science**, v. 134, p.76-83, 2012.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, p. 599-616, 2003.

GASPAR, R.C.; ARNOLD, D.R.; CORRÊA, C.A.; DA ROCHA, C.V.; PENTEADO, J.C.; DEL COLLADO, M.; VANTINI, R.; GARCIA, J.M.; LOPES, F.L. Oxygen tension affects histone remodeling of *in vitro*-produced embryos in a bovine model. **Theriogenology**, v. 83, p. 1408-1415, 2015.

GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S.EL.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v. 7, p. 175-189, 2001.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Roca, São Paulo, BR, 2008.

HASLER, J.F. Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. **Theriogenology**, v. 81, p. 152-169, 2014.

HASLER, J.F.; BARFIELD, J.P. *In vitro* fertilization. In: HOPPER, R.M. **Bovine Reproduction**. Wiley-Blackwell Publishing, Iowa, EUA, p. 758-770, 2015.

IETS, The International Embryo Transfer Society. 2015 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Disponível em:
<http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2015.pdf>. Acesso em: 08 dezembro 2017.

KATZ-JAFFE, M.G.; LINCK, D.W.; SCHOOLCRAFT, W.B.; GARDNER, D.K. A proteomic analysis of mammalian preimplantation embryonic development. **Reproduction**, v. 130, p. 899-905, 2005.

KHAZAEI, M.; AGHAZ, F. Reactive oxygen species generation and use of antioxidants during *in vitro* maturation of oocytes. **International Journal of Fertility & Sterility**, v. 11, p. 63-70, 2017.

KNIJN, H.M.; WRENZYCKI, C.; HENDRIKSEN, P.J.; VOS, P.L.; HERRMANN, D.; VAN DER WEIJDEN, G.C.; NIEMANN, H.; DIELEMAN, S.J. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived *in vitro* or *in vivo*. **Reproduction**, v. 124, p 365-375, 2002.

KRISHER, R.L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 14-23, 2004.

KRISHER, R.L.; LANE, M.; BAVISTER, B.D. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1345-1352, 1999.

LAMPIAO, F.; OPPERMAN, C.J.; AGARWAL, A., DU PLESSIS, S.S. Oxidative stress. In: **Male Infertility**. Springer, New York, EUA, p. 225-235, 2012.

LANGBEEN, A.; BARTHOLOMEUS, E.; LEROY, J.L.; BOLS, P.E. Bovine *in vitro* reproduction models can contribute to the development of (female) fertility preservation strategies. **Theriogenology**, v. 84, p. 477-489, 2015.

LEE, M.; GRAZI, R.; SEIFER, D. Incorporation of the K-Minc incubator and media system into the IVF lab: the future of IVF. **Journal of Clinical Embryology**, v. 13, p. 21-32, 2013.

LEESE, H.J. Metabolic control during preimplantation mammalian development. **Human Reproduction Update**, v. 1, p. 63-72, 1995.

LOIOLA, V.G.L.; CHALHOUB, M.; RODRIGUES, A.S. FERRAZ, P.A.; BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.L. Validação de um programa de produção *in vitro* de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. **Ciência Animal Brasileira**, v.15, p. 93-101, 2014.

LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of oocytes *in vitro*. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, p. 255-268, 2016.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A.C.O. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 137-152, 2006.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: Effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 28, p. 259-267, 2003.

LOCATELLI, Y.; HENDRIKS, A.; VALLET, J.C.; BARIL, G.; DUFFARD, N.; BON, N.; ORTIZ, K.; SCALA, C.; MAUREL, M.C.; MERMILLOD P.; LEGENDRE, X. Assessment LOPU-IVF in Japanese sika deer (*Cervus nippon nippon*) and application to Vietnamese sika deer (*Cervus nippon pseudaxis*) a related subspecies threatened with extinction. **Theriogenology**, v. 78, p. 2039-2049, 2012.

LOPERA-VASQUEZ, R.; HAMDI, M.; MAILLO, V.; LLOREDA, V.; COY, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; RIZOS, D. Effect of bovine oviductal fluid on development and quality of bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, p. 621-629, 2017.

LOPES, A.S.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oxygen consumption and ROS production are increased at the time of fertilization and cell cleavage in bovine zygotes. **Human Reproduction**, v. 25, p. 2762-2773, 2010.

MAILLO, V.; LOPERA-VASQUEZ, R.; HAMDI, M.; GUTIERREZ-ADAN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D. Maternal-embryo interaction in the bovine oviduct: evidence from *in vivo* and *in vitro* studies. **Theriogenology**, v. 86, p. 443-450, 2016.

MARINHO, L.S.R.; UNTURA, R.M.; MOROTTI, F.; MOINO, L.L.; RIGO, A.G.; SANCHES, B.V.; PONTES, J.H.F.; SENEDA, M.M. Large-scale programs for recipients of *in vitro*-produced embryos. **Animal Reproduction**, v. 9, 323-28, 2012.

OLSON, S.E.; SEIDEL JR.; G.E. Reduced oxygen tension and EDTA improve bovine zygote development in a chemically defined medium. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 152-157, 2000.

PANDEY, A.N.; TRIPATHI, A.; PREMKUMAR, K.V.; SHRIVASTAV, T.G.; CHAUBE, S.K. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 111, p. 521-528, 2010.

PERKEL, K.J.; TSCHERNER, A.; MERRILL, C.; LAMARRE, J.; MADAN, P. The ART of selecting the best embryo: A review of early embryonic mortality and bovine embryo viability assessment methods. **Molecular Reproduction and Development**, v. 82, p. 822-838, 2015.

PONTES, J.H., MELO-STERZA, F.A., BASSO, A.C., FERREIRA, C.R., SANCHES, B.V., RUBIN, K.C., SENEDA, M.M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and

pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, p. 1640-1646, 2011.

PONTES, J.H.F.; SILVA, K.C.F.; BASSO, A.C.; RIGO, A.G.; FERREIRA, C.R.; SANTOS, G.M.G.; SANCHES, B.V.; PORCIONATO, J.P.F.; VIEIRA, P.H.S.; FAIFER, F.S.; STERZA, F.A.M.; SCHENK, J.L.; SENEDA, M.M. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v. 74, n. 8, p. 1349-1355, 2010.

POOL, T.B. Development of culture media for human assisted reproductive technology. **Fertility Sterility**, v. 81, p. 287-289, 2004.

REZAEI, N.; CHIAN, R.C. Effects of essential and non-essential amino acids on *in vitro* maturation, fertilization and development of immature bovine oocytes. **Iranian Journal of Reproduction Medicine**, v. 3, p. 36-41, 2005.

ROSENKRANS JR, C.F.; ZENG, G.Q.; MCNAMARA, G.T.; SCHOFF, P.K., FIRST, N. L. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 459-462, 1993.

STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G.; PURDY, J.M. Human blastocysts grown in culture. **Nature**, v. 229, p. 132-133, 1971.

TAKAHASHI, M. Oxidative stress and redox regulation on *in vitro* development of mammalian embryos. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 58, n. 1, p. 1-9, 2012.

THOMPSON, J.G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 263-275, 2000.
TSUNODA, S.; KIMURA, N.; FUJII, J. Oxidative stress and redox regulation of gametogenesis, fertilization, and embryonic development. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 13, p. 71-79, 2014.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.; MULLAART, E.; DE ROOS, A.P.; MERTON, J.S.; DEN DAAS, J.H.; KEMP, B. DE RUIGH, L. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology**, v. 53, p. 575-597, 2000.

VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHAO, M.P.; CAMARGO, L.S.A. Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 12-18, 2012.

YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, A.; COOPMAN, F.O.J.; MINTIENS, K.; BOERJAN, M.L.; VAN ZEVEREN, A.; DE KRUIF, A.; PEELMAN, L.J. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 59, p. 1585-1596, 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE A – RESUMO NOS ANAIS DA XXXI REUNIÃO ANUAL DA
SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2017

Evaluation of different incubation systems on bovine *in vitro* embryo production

C.M. Cavalcanti, I.S. Campelo, M.M.A.S. Silva, T.V.D. Teixeira; J.V.S. Albuquerque,
L.M. Melo, V.J.F. Freitas

The use of reproductive biotechniques, such as *in vitro* embryo production (IVP) may contribute to the genetic improvement of the bovine herd. In this context, many efforts have been made to obtain culture systems that are less harmful to embryos. This study aimed to evaluate both the maturation rate and bovine blastocyst production using three different incubation systems. Follicles of 2-8 mm were punctured from bovine ovaries obtained in local slaughterhouses. The obtained *cumulus*-oocyte complexes (COCs) were randomly divided into three groups according to the incubation system: conventional bench incubator - CONV (Thermo, Thermo Fischer, Waltham, USA) with high oxygen tension (5% CO₂), mini-bench incubator - MIN Ib (Eve, WTA, Cravinhos, Brazil) with low oxygen (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂) and mini portable incubator - MIN Ip (LabMix, WTA) also with low oxygen tension. *In vitro* maturation (IVM) was performed in TCM-199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) supplemented for 22 h at 38.5 °C. After this, a sample of oocyte was stained with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) and analyzed by fluorescence microscopy (Eclipse E400, Nikon, Tokyo, Japan) in order to determine the maturation rate. For *in vitro* fertilization (IVF), COCs were incubated with frozen/thawed semen in Brackett-Oliphant medium (BO) for 6 h at 38,5 °C. *In vitro* culture (IVC) was performed for 8 days in synthetic oviduct fluid (SOF) at 38.5 °C. Cleavage rate was verified on day two (D2) and blastocyst rate on days seven (D7) and eight (D8) of culture. Data were analyzed by the Student *t* test with 5% of significance level. No significant differences were found for the maturation rate, which was 70.4%, 50.8% and 57.6% for CONV, MIN Ib and MIN Ip, respectively. A total of 1067 (CONV = 359; MIN Ib = 356; MIN Ip = 352) presumable zygotes were submitted to culture. Concerning cleavage rate, CONV (71.0%) produced the better results ($P < 0.05$) when compared to MIN Ib (44.1%) and MIN Ip (35.8%). Similarly, significant differences ($P < 0.05$) were verified for blastocyst production in D7 (CONV = 32.0%, MIN Ib = 21.1%, MIN Ip = 11.4%) and D8 (CONV = 32.0%, MIN Ib = 21.1%, MIN Ip =

12.8%). In conclusion, the incubation system provided by CONV resulted in higher rates for embryo production. However, it is necessary more repetitions for definitive conclusions.

Keywords: oxygen concentration, portable incubator, maturation.

APÊNDICE B – RESUMO NOS ANAIS DA XXII SEMANA UNIVERSITÁRIA DA UECE, 2017.

Avaliação da produção *in vitro* de embriões bovinos em diferentes sistemas de maturação e cultivo

Camila Muniz Cavalcanti, Iana Sales Campelo, Mirelly Mirna Alves de Sousa Silva, Thiago Victor Damasceno Teixeira, João Victor da Silva Albuquerque, Luciana Magalhães Melo, Vicente José de Figueirêdo Freitas

A utilização de biotécnicas reprodutivas, como a produção *in vitro* de embriões contribuiu para o desenvolvimento da bovinocultura brasileira, que possui o maior rebanho comercial do mundo, com 215,2 milhões de cabeças. Neste contexto, muitos esforços vêm sendo realizados para se obter métodos de cultivo menos prejudiciais aos embriões. Portanto, objetivou-se avaliar a qualidade de embriões bovinos em três diferentes sistemas de incubação. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (Protocolo nº 4024452-2017). Folículos obtidos de ovários bovinos de abatedouros foram puncionados obtendo-se complexos *cumulus*-oócito (CCOs), nos quais foram divididos aleatoriamente em três grupos de acordo com o sistema de incubação: incubadora convencional de bancada - CONV (Thermo-Forma, Thermo Fischer, Waltham, EUA) com elevada tensão de oxigênio (5% CO₂), mini incubadora de bancada - MINib (Eve, WTA, Cravinhos, Brasil) com baixa tensão de oxigênio (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂) e mini incubadora portátil - MINIp (LabMix, WTA) também com baixa tensão de oxigênio. Os CCOs foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) em TCM-199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e mantidos a 38,5 °C por 22 h. Após a MIV, uma parcela de CCOs obtidos foi submetida à coloração com Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) e analisados em microscópio óptico (Eclipse E400, Nikon, Tóquio, Japão) com fluorescência, no qual os oócitos foram classificados, de acordo com a conformação da cromatina, em vesícula germinativa (VG), metáfase I (MI) e metáfase II (MII). Para a fecundação *in vitro* (FIV), os CCOs foram coincubados em gotas de 100 µL de suspensão de espermatozoides contendo meio Brackett-Oliphant (BO) com concentração de 20×10^6 espermatozoides/mL, cobertas com óleo mineral, a 38,5°C durante 6 h. Após a FIV, os presumíveis zigotos foram submetidos ao cultivo *in vitro* (CIV) por oito dias em meio SOF coberto com óleo mineral, a 38,5°C e atmosfera

umidificada. As taxas de clivagem foram avaliadas no dia dois (D2) e a taxa de blastocistos nos dias sete (D7) e oito (D8) de cultivo. As taxas obtidas foram comparadas pelo teste exato de Fisher com significância de $P < 0,05$. Um total de 1683 (CONV = 677; MIN Ib = 551; MIN Ip = 455) presumíveis zigotos foram submetidos ao cultivo. Ao comparar as taxas de maturação (VG, MI e MII) para os três diferentes sistemas de incubação, não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre nenhum dos grupos avaliados. Porém, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre o grupo CONV e os demais grupos, ao comparar as taxas de clivagem (CONV = 72,82%; MIN Ib = 61,71%; MIN Ip = 61,32%). Para blastocistos no D7, o grupo MIN Ip (22,64%) diferiu estatisticamente de CONV (32,20%) e MIN Ib (29,22%). Para as taxas de blastocistos no D8, o grupo CONV diferiu estatisticamente do grupo MIN Ip (CONV = 32,91%; MIN Ib = 32,41%; MIN Ip = 27,35%) de cultivo. Podemos concluir que a utilização de um sistema de incubação portátil com baixa tensão de oxigênio (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂) não é uma alternativa viável para a PIVE bovina.

Palavras-chave: tensão de oxigênio, incubadora portátil, competência ao desenvolvimento.