



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**MARCADORES BIOQUÍMICOS PARA SELEÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO***

GABRIELA DE OLIVEIRA FERNANDES

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA
SETEMBRO DE 2020



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA – FAV

**MARCADORES BIOQUÍMICOS PARA SELEÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO***

GABRIELA DE OLIVEIRA FERNANDES

ORIENTAÇÃO: DRA. MARGOT ALVES NUNES DODE

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: nº/2020

BRASÍLIA

SETEMBRO DE 2020

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA – FAV

MARCADORES BIOQUÍMICOS PARA SELEÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO*

GABRIELA DE OLIVEIRA FERNANDES

**Tese de doutorado apresentado ao curso de
pós-graduação em Ciências Animais da
Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária da Universidade de Brasília.**

APROVADA POR:

Dra. Margot Alves Nunes Dode (Orientadora/Embrapa/UnB)

Dr. Maurício Machaim Franco (Examinador Externo/Embrapa/UFU)

Dra. Giane Regina Paludo (Examinador Interno/UnB)

Dr. Mateus José Sudano (Examinador Externo/ UFABC)

Dra. Carolina Madeira Lucci (Suplente/ UnB)

Brasília / DF, 25 de Setembro de 2020.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

FERNANDES, G. O. **Marcadores bioquímicos para seleção de embriões bovinos produzidos *in vitro***. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2020, 118p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando a reprodução desta Tese de Doutorado para empréstimo, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado pela Secretaria do Programa. O autor e sua orientadora reservam para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta Tese de Doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou da sua orientadora. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

FERNANDES, G. O. **Marcadores Bioquímicos para seleção de embriões bovinos produzidos *in vitro***. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2020, 118p. Tese de Doutorado.

1. Bovinos. 2. Biomarcadores. 3. Embriões 4. *Eletrospray*. 5. Líquido da Blastocèle. 6. Metabólitos. 7. Fluorimetria.

AGRADECIMENTOS

A Deus por nunca me abandonar.

Aos meus pais Neusa (*in memorium*) e Ivan, pelo amor incondicional, conselhos e incentivos.

Ao meu noivo PhD. Stephan Alberto, pelo companheirismo, amor e compreensão.

Ao meu irmão Gustavo.

Aos meus queridos e amados avós Doralina, Terezinha e Nery, todos *in memorium*.

Aos demais familiares e amigos que sempre torceram para a concretização deste trabalho.

A minha orientadora PhD. Margot Dode pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pelos ensinamentos e aprendizados.

Aos pesquisadores do LRA, em especial ao Dr. Maurício Machaim, e do LEM da Embrapa Cenargen, que contribuíram para a realização deste trabalho e na minha formação.

Aos colegas do LRA e LEM que doaram seu tempo, seus conhecimentos, sua companhia, amizades que eu fiz e levarei daqui.

Aos colaboradores da Embrapa Cenargen, em especial aos técnicos do LRA e aos funcionários da fazenda experimental sucupira.

Aos pesquisadores Dr. Carlos Frederico Martins, Dr. Luciano Paulino, Dra. Marcella Milazzotto, PhD. Fernando Biase e a empresa Bio Biotecnologia Animal que disponibilizaram seus tempos, conhecimentos e estrutura laboratorial.

A Universidade de Brasília, em especial ao programa de pós-graduação em Ciências Animais.

A Capes pelo apoio financeiro.

Aos animais.

A Mariana Piva em nome da fazenda Paranã e ao Dr. José Luis Abohiam Gonçalves em nome da fazenda Esplanada por disponibilizarem suas propriedades e animais para a realização destes estudos.

E, a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para eu chegar até aqui.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	16
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 PROBLEMÁTICA E RELEVÂNCIA.....	19
1.2 OBJETIVOS	20
1.3 HIPÓTESE	20
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
CAPÍTULO 2	40
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIV).....	48
2.2 Coleta do meio de cultivo.....	49
2.3 Cromatografia do meio de cultivo	49
2.4 Extração dos metabólitos.....	50
2.5 Espectrometria de massa	50
2.6 Análise estatística	51
3. RESULTADOS	52
3.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões PIV	52
3.2 Análises cromatográficas.....	53
3.3 Espectrometria de massa	57
4. DISCUSSÃO.....	60
5. CONCLUSÃO.....	63
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	64
CAPÍTULO 3.....	67
1. INTRODUÇÃO	70
2. MATERIAL E MÉTODOS	72
2.1 Obtenção dos complexos <i>cumulus</i> ovócito e maturação <i>in vitro</i>	72
2.2 Fecundação e cultivo <i>in vitro</i>	72
2.3 Coleta do meio de cultivo	73
2.4 Transferência dos embriões (TE), diagnóstico de gestação e sexagem fetal.....	73
2.5 Extração dos metabólitos	74

2.6	Espectrometria de massa (ESI-MS)	74
2.7	Quantificação do Piruvato, Lactato e Glutamato	75
2.8	Análise estatística.....	75
3.	RESULTADOS.....	76
3.1	Produção <i>in vitro</i> de embriões e diagnóstico de gestação.....	76
3.2	Espectrometria de massa (ESI-MS)	77
3.3	Quantificação fluorimétrica do meio de cultivo	80
4.	DISCUSSÃO	83
5.	CONCLUSÃO.....	87
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
	CAPÍTULO 4	95
1.	INTRODUÇÃO.....	98
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	101
2.1	Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	101
2.2	Produção <i>in vivo</i> de embrião	102
2.3	Coleta do líquido da blastocele (LB)	103
2.4	Espectrometria de Massa (MS)	103
2.5	Análise estatística	104
3.	RESULTADOS.....	105
4.	DISCUSSÃO	109
5.	CONCLUSÃO	111
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
	CAPÍTULO 5	122
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	123

RESUMO

MARCADORES BIOQUÍMICOS PARA SELEÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Gabriela de Oliveira Fernandes¹, Margot Alves Nunes Dode^{1,2}

¹ Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Programa de pós-graduação em Ciências Animais; ² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília /DF

A produção *in vitro* de embriões é uma biotecnologia bem estabelecida tanto na reprodução humana como em animais de produção, porém as taxas de gestação e nascimento após a transferência ainda continuam baixas. Devido a este cenário, existe uma demanda por metodologias que possam selecionar com maior precisão embriões com maior capacidade de estabelecer uma gestação. Portanto, o objetivo do presente estudo foi identificar marcadores bioquímicos para a qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* usando diferentes estratégias. A primeira, foi a identificação de marcadores para qualidade embrionária no meio em que os embriões foram cultivados. Para isso, o meio do cultivo dos embriões que geraram ou não prenhez foram comparados quanto ao perfil metabólico pela técnica de espectrometria de massa com ionização em eletrospray (ESI-MS) e quanto a concentração de piruvato, lactato e glutamato, pela técnica de fluorimetria. Os embriões produzidos *in vitro* foram cultivados em gotas individuais por 48 horas, entre os dias (D) 5 e 7 de cultivo. No D7, o meio foi coletado e armazenado individualmente e os embriões foram transferidos para receptoras. Após o diagnóstico de gestação, o meio foi agrupado em dois grupos: meio do cultivo de embriões que geraram prenhez e o dos que não geraram prenhez. O resultado da espectrometria mostrou uma maior intensidade de sinal no meio do grupo que gerou prenhez comparado ao não prenhe. Na quantificação fluorimétrica foi observada uma maior concentração de piruvato e menor de lactato no meio de cultivo de blastocistos expandidos que geraram prenhez. A segunda estratégia para

identificar possíveis biomarcadores de qualidade embrionária foi comparar o perfil metabólico do líquido da blastocele (LB) de blastocistos expandidos (Bx) produzidos *in vivo* e *in vitro*. Para isso, os embriões foram produzidos e no D7 do desenvolvimento foram submetidos à micromanipulação para a retirada do LB, que foi analisado por ESI-MS. Os perfis observados neste estudo claramente distinguem os embriões *in vivo* dos embriões *in vitro*. Os íons 437,18 m/z e 453,15 m/z detectados no LB dos embriões *in vivo* e o íon 398,06 m/z no LB dos *in vitro* são biomarcadores de embriões de diferentes origens com 100% de sensibilidade e especificidade. Conclui-se que em ambas as estratégias adotadas neste trabalho foi possível identificar marcadores bioquímicos para qualidade de embriões bovinos.

Palavras-chave: biomarcadores, blastocisto, *eletrospray*, espectrometria de massa, líquido da blastocele, meio de cultivo, metabólitos

ABSTRACT

BIOCHEMICAL MARKERS FOR SELECTION OF *IN VITRO* PRODUCED BOVINE EMBRYOS

Although *in vitro* embryo production (IVP) is an established technique that has been routinely used in humans and in domestic animal, the pregnancy and birth rates after transfer are still low. Due to this scenario, there is a need to establish a methodology for selecting embryos with greater implantation and birth potential. The aim of the present study was to identify biochemical markers for embryo quality using different strategies. The first was to use the culture medium to identify non-invasive markers of embryonic quality. For that, the culture medium of the embryos that generated or not generated pregnancy were compared in terms of the metabolic profile using the electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and the concentration of pyruvate, lactate and glutamate, using the fluorimetry approach. Embryos produced *in vitro* were cultured in individual drops for 48 hours, between days (D) 5 and 7 of culture. At D7, the medium was collected and stored individually, and the embryos were transferred to the recipients. After the pregnancy diagnosis, the medium was separated into two groups: the culture medium from embryos that generated pregnancy and medium from those which did not generate pregnancy. The spectrometry result showed a higher signal intensity in the medium from the group that generated pregnancy compared to the non-pregnant group. Fluorimetric quantification showed a higher concentration of pyruvate and lower concentration of lactate in the culture medium of expanded blastocysts that generated pregnancy. The second strategy to identify possible biomarkers of embryo quality was to compare the metabolic profile of blastocoel fluid (BF) from expanded blastocysts (Bx) produced *in vivo* and *in vitro*. For that, embryos were produced and at D7 of the development the embryos were submitted to micromanipulation to remove the BF, which was analyzed by ESI-MS. The profiles observed in this study clearly distinguished *in vivo* embryos from those cultured *in vitro*. The ions 437.18 m/z and 453.15 m/z detected in the BF of *in vivo* embryos and the ion 398.06 m/z present in *in*

vitro culture, are biomarkers of embryos from different origins with 100% sensitivity and specificity. In conclusion, both strategies adopted in this study were able to identify biochemical markers for quality of bovine embryos.

Key words: biomarkers, blastocyst, *electrospray*, mass spectrometry, blastocoel fluid, culture media, metabolites.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Gráfico do cromatograma do meio de cultivo de embrião bovino cultivado em meio de cultivo suplementado de 0,4% de albumina sérica bovina e 10 mg/mL insulina; 5,5 mg/mL transferrina e 5 µg/mL selênio (BSA+ITS) entre D5 e D7 do desenvolvimento embrionário. O eixo x indica o tempo de retenção em que os compostos foram eluídos. Até os 5 min região hidrofílica, dos 5 aos 25 min região de eluição. (A) cromatograma do meio controle (sem embrião); (B) cromatograma do meio de cultivo com embrião (Bx)..... **55**
- Figura 2.** Gráfico dos cromatogramas do gradiente de eluição do meio de cultivo sem 0,4% de albumina sérica bovina e 10 mg/mL insulina; 5,5 mg/mL transferrina e 5 µg/mL selênio (BSA+ITS). (A) cromatograma do meio de cultivo sem adição de glutamina. (B) cromatograma do meio de cultivo com adição de glutamina. (C) cromatograma da amostra controle (água deionizada + glutamina). Eixo X indica o tempo de retenção de cada composto eluído. **56**
- Figura 3.** Gráfico dos cromatogramas do gradiente de eluição da fração proteica do meio de cultivo de embriões bovino. (A) meio de cultivo com embrião (Bx), (B) Meio de cultivo controle (sem embrião)..... **57**
- Figura 4.** Concentração da albumina em unidades arbitrárias do meio de cultivo controle (sem embrião) e com embrião (Bx – blastocisto expandido). Dados analisados por Test t (p = 0,95)..... **57**
- Figura 5.** Espectros de massa obtidos por Impact II ESI-Q/TOF das amostras de meios de cultivo de embriões bovino obtidos em modo íon positivo na faixa analisada 50 – 1500 m/z. Eixo x: m/z: massa carga; eixo y: intensidade de sinal. Espectros representativos de todas as amostras controle (sem embrião) e Blastocisto expandido (Bx) analisadas. (A) Branco (B) três amostras do sobrenadante dos meios de cultivo Bx e (C) três amostras de sobrenadantes do meio de cultivo controle..... **59**
- Figura 6.** Análise do meio de cultivo de embriões bovinos produzidos in vitro do grupo controle (verde) e blastocisto expandido (Bx- vermelho) em meio de cultivo suplementado de 0,4% de albumina sérica bovina e 10 mg/mL insulina; 5,5 mg/mL transferrina e 5 µg/mL selênio (BSA+ITS). (A) Análise das componentes principais (PCA) score plot PCA 1 x PCA 2. (B) Representação gráfica das análises por Dendograma..... **60**

CAPÍTULO 3

Figura 1. Perfis espectrométricos do meio de cultivo individual (últimas 48 horas) de embriões bovinos produzidos in vitro dos grupos prenhe (P - azul), não prenhe (NP - vermelho). Os perfis foram analisados em espectrômetro de massa Impact II ESI-Q/TOF® com ionização tipo eletrospray operando em modo positivo. (A) Faixa de massa 50 - 1500 m/z. (B) Faixa de massa 50 - 550 m/z.....**79**

Figura 2. Determinação da prenhez, análise do meio de cultivo individual (D5-D7) de embriões bovinos que geraram ou não prenhez. (A) Volcano plot - pontos rosa representam íons sobre o threshold, grupo prenhe (lado esquerdo) e grupo não prenhe (lado direito). (B) Análise das componentes principais, em que o grupo prenhe está representado pelos pontos azuis e o grupo não prenhe pelos pontos vermelhos, sendo que a esfera que circunda os grupos representa 95% de intervalo de confiança. (C) Análise discriminativa de mínimos quadrados parciais PLS-DA dos íons com importância variável de projeção (VIP). (D) Representação gráfica (curva receiver operating characteristic - ROC) da especificidade e sensibilidade dos íons 156.1373 m/z, 444.335 m/z, 305.97525 m/z, área sob a curva (AUC) em azul. (E) Curva ROC para modelos de biomarcadores conforme o aumento no uso de variáveis (íons).....**80**

Figura 3. Determinação da prenhez, análise do meio de cultivo individual (D5-D7) de embriões bovinos que geraram ou não prenhez. (A) Volcano plot - pontos rosa representam íons sobre o threshold, grupo prenhe (lado esquerdo) e grupo não prenhe (lado direito). (B) Análise das componentes principais, em que o grupo prenhe está representado pelos pontos azuis e o grupo não prenhe pelos pontos vermelhos, sendo que a esfera que circunda os grupos representa 95% de intervalo de confiança. (C) Análise discriminativa de mínimos quadrados parciais PLS-DA dos íons com importância variável de projeção (VIP). (D) Representação gráfica (curva receiver operating characteristic - ROC) da especificidade e sensibilidade dos íons 156.1373 m/z, 444.335 m/z, 305.97525 m/z, área sob a curva (AUC) em azul. (E) Curva ROC para modelos de biomarcadores conforme o aumento no uso de variáveis (íons).....**81**

Figura 4. Análise dos metabólitos por gênero. (A) Perfil metabólico das últimas 48 horas do meio de cultivo individual de embriões bovinos macho (azul) e fêmea (rosa) produzidos in vitro. Faixa de massa analisa 50 - 1500 m/z. (B) Concentração de piruvato (μM) e lactato (μM) detectado no meio de cultivo de embriões macho e fêmea que geraram prenhez. Dados mostrados em média \pm SEM.....**83**

CAPÍTULO 4

- Figura 1.** Coleta do líquido da blastocele de blastocisto expandido bovino D7 (20x). (A) Blastocisto expandido intacto antes da coleta. (B) A micropipeta é introduzida na blastocele para iniciar a coleta do líquido. (C) aproximadamente 30% do líquido coletado. (D) Coleta completa do líquido da blastocele.....**104**
- Figura 2.** Perfil espectrométrico representativo do líquido da blastocele (LB) de blastocistos expandidos bovino *in vivo* (azul) e *in vitro* (vermelho) no dia sete (D7) de desenvolvimento embrionário. (A) *in vivo* (acima) e *in vitro* (abaixo). (B) *in vivo* e *in vitro* com faixa de massa de 50 - 300 *m/z*; (C) *in vivo* e *in vitro* com faixa de massa de 300-650 *m/z*; (D) *in vivo* e *in vitro* com faixa de massa de 50-650 *m/z*.....**107**
- Figura 3.** Gráfico Volcano *plot* do líquido da blastocele *in vivo* e *in vitro* *Fold Change* (FC) com *threshold* (4) e valor de *p* significativo (pontos em rosa). Os íons identificados no gráfico do *in vivo* (esquerda) e *in vitro* (direita) representam maior FC e menor valor de *p*.**108**
- Figura 4.** (A) Gráfico de Volcano *plot* dos íons do líquido da blastocele *in vivo* e *in vitro* com *Fold Change* (FC) > 4 e $p \leq 0,05$ (pontos rosa). Os dez íons identificados, cinco íons à esquerda (grupo *in vivo*) e cinco íons à direita (grupo *in vitro*) representam aqueles com maior FC e menor valor de *p*. (B) A análise discriminatória de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) mostra o gráfico de pontuação 2-D entre o líquido da blastocele *in vivo* (vermelho) e *in vitro* (verde). As elipses representam um intervalo de confiança de 95%.....**109**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Produção *in vitro* de embriões bovinos cultivados em grupo até o dia 5 e individualmente do dia 5 ao dia 7 em meio de cultivo suplementado com soro fetal bovino (SFB), com 0,4% de albumina sérica bovina (BSA) ou com 0,4% BSA associado à 10 mg/mL insulina; 5,5 mg/mL transferrina e 5 µg/mL selênio (BSA+ITS).....**53**

Tabela 2: Produção *in vitro* de embriões bovinos cultivados em grupo até o dia 5 (D5) e individualmente entre os dias 5 e 7 (D7) do desenvolvimento embrionário em meio de cultivo suplementado com 0,4% de albumina sérica bovina e 10 mg/mL insulina; 5,5 mg/mL transferrina e 5 µg/mL selênio (BSA+ITS).....**54**

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Produção *in vitro* de embriões bovinos a partir de complexo cumulus ovócitos (CCOs) obtidos pela técnica de ovum pick up (OPU) de 12 doadoras. Os embriões foram cultivados em grupos até o dia 5 (D5) do cultivo e apenas aqueles que estavam em estágio de mórula foram cultivados individualmente do D5 até o D7.**77**

Tabela 2. Número de transferências, diagnóstico de gestação (30 e 60 dias) e sexagem fetal (60 dias) de embriões produzidos *in vitro* e cultivados individualmente entre os dias 5 e 7 do desenvolvimento embrionário.**78**

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) bovinos é uma biotécnica já estabelecida e utilizada rotineiramente nos laboratórios, mas sua eficiência ainda é considerada baixa. Isso, deve-se, principalmente, as baixas taxas de prenhez e nascimento resultante da menor qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro* associada à incapacidade de selecionar aqueles com maior potencial de gerar uma prenhez. Desta forma, a avaliação da qualidade do embrião é fundamental para que se possam selecionar aqueles com maior capacidade de implantação, e com isso aumentar a eficiência da PIV. Situação semelhante, ocorre em humanos, visto que a cada três ciclos de fecundação *in vitro* em dois ocorrem falhas gestacionais. Esses resultados sugerem que se somente os embriões de melhor qualidade fossem transferidos as taxas seriam maiores trazendo muitos benefícios para os pacientes (Seli et al., 2010).

Nos laboratórios de PIV, a seleção dos embriões é realizada rotineiramente de acordo com critérios morfológicos, que apesar de ser uma avaliação não invasiva e de baixo custo, não é um indicador confiável da capacidade do embrião de iniciar uma gestação (Marhuenda-Egea et al., 2010). Portanto, existe uma grande necessidade de que parâmetros mais robustos e acurados de seleção sejam estabelecidos para garantir que somente os melhores sejam transferidos. Estudos recentes sugerem que o perfil metabólico do embrião avaliado no meio em que esse é cultivado, pode indicar o seu *status* fisiológico de maneira não invasiva. A maioria dos estudos nessa área avaliam compostos específicos como a glicose, piruvato, lactato, homocisteína, aminoácidos e concentração de O₂ no meio de cultivo (Gardner et al., 2001; Sakkas e Gardner, 2005; Gardner et al., 2011; Henry, 2012; Sugimura et al., 2012; Boyama et al., 2016). Entretanto, as novas técnicas utilizadas para a avaliação do meio como a cromatografia e espectrometria de massa permitem identificar uma grande variedade de moléculas (proteínas, açúcares, lipídeos) presentes no meio de cultivo (Kirkegaard et al., 2014; Krisher et al., 2015; Krisher et al., 2015).

A sensibilidade e especificidade dessas técnicas permitem a avaliação individual dos embriões e elimina a necessidade de formar *pools*, permitindo associar perfis metabólicos específicos com a competência após a transferência (Muñoz et al., 2014; Krisher et al., 2015). Além disso, essa avaliação pode fornecer dados sobre as vias bioquímicas que o embrião utiliza sob diferentes condições de cultivo, o qual permite manipular o sistema de produção melhorando seu desenvolvimento.

Outra potencial abordagem para a identificação de marcadores é o estudo do líquido da blastocela (LB), pois esse também pode conter informações referentes à qualidade dos embriões. O LB é predominantemente água e depende do sistema de transporte de íons das células apolares do trofotoderma (Barcroft, 2001). O LB tem papel fundamental na pré-implantação e está diretamente relacionado com o suporte do desenvolvimento do blastocisto (Jensen et al., 2014; Magli et al., 2016). O LB, que também possui, metabólitos torna-se mais uma alternativa como fonte de material a ser analisado na tentativa de identificar um potencial marcador bioquímico para distinguir embriões de diferentes qualidades (Gopichandran e Leese, 2003; D'alessandro et al., 2012; Jensen et al., 2012).

Em humanos, o LB está sendo utilizado para a obtenção de material genético (Tobler et al., 2015) e para testes de alterações cromossômicas (Zhang et al., 2016). Já em animais domésticos, em especial nos bovinos e equinos, a remoção do LB tem sido realizada para a criopreservação dos embriões (Min et al., 2014; Diaz et al., 2016; Marques et al., 2018), pois a presença deste líquido desfavorece as taxas de sobrevivência do embrião devido à formação de cristais de gelo durante este procedimento (Vajta e Kuwayama, 2006). No caso da criopreservação, o LB é retirado e descartado, sem que nenhuma investigação sobre seu conteúdo seja feita. De fato, os estudos que visam caracterizar a composição metabólica do LB em bovinos são muito escassos (Gopichandran e Leese, 2003; Jensen et al., 2014), tendo poucas informações disponíveis.

Este trabalho visa, avaliar o meio de cultivo e o LB de embriões bovino com o objetivo de identificar moléculas que possam ser utilizados como marcadores de qualidade para selecionar, de forma mais acurada, embriões PIV com maior potencial de implantação.

1.1 PROBLEMÁTICA E RELEVÂNCIA

A produção *in vitro* de embriões é uma biotecnologia bem estabelecida comercialmente, mas que ainda apresenta alguns entraves, dentre os quais pode-se destacar a qualidade inferior dos embriões produzidos. Essa baixa qualidade se reflete nas altas perdas embrionárias e fetais que comprometem a eficiência da técnica. Portanto, é fundamental o estabelecimento de métodos mais eficazes para selecionar os embriões a serem transferidos. A seleção utilizada rotineiramente é baseada em características morfológicas, sendo, portanto, um método muito subjetivo e que pouco nos diz sobre a capacidade dos embriões estabelecerem uma gestação. Muitas técnicas invasivas e não invasivas estão sendo testadas em diferentes espécies, mas até o presente nenhum biomarcador consistente e capaz de prever o sucesso da transferência foi identificado. Portanto, o presente estudo visa estabelecer parâmetros mais robustos que possam ser utilizados para garantir que somente os melhores embriões sejam transferidos através da identificação desses embriões por biomarcadores. O uso de biomarcadores teria um impacto significativo para todos os segmentos envolvidos na produção de embriões, pois permitiria a seleção de embriões mais competentes, reduzindo perdas econômicas e aumentando a eficiência da técnica.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Geral

Identificar marcadores bioquímicos para qualidade embrionária no meio de cultivo e LB de embriões bovinos produzidos *in vitro*

1.2.2 Específicos

- Estabelecer procedimentos para avaliar por espectrometria de massa o meio de cultivo em que os embriões bovinos são produzidos;
- Identificar marcadores bioquímicos no meio de cultivo de embriões bovinos que geram ou não prenhez pela técnica de espectrometria de massa;
- Analisar o perfil metabólico do líquido da blastocela de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*.

1.3 HIPÓTESE

1) O meio de cultivo dos embriões produzidos *in vitro* pode predizer o seu potencial de prenhez.

2) O perfil metabólico do líquido da blastocela dos embriões produzidos *in vitro* é diferente dos embriões produzidos *in vivo*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Dentre as biotecnologias da reprodução assistida, o uso da produção *in vitro* de embriões (PIV) em bovinos tem crescido nos últimos anos tanto em rebanhos leiteiros como de corte. O principal objetivo da PIV é obter rápido ganho genético na característica desejada em um menor intervalo de tempo. Uma das vantagens dessa biotécnica é a diversidade na obtenção dos ovócitos que pode ser de vacas cíclicas, vacas que não respondem a protocolos de superovulação ou apresentam algum problema no trato reprodutivo, animais prenhes até o primeiro trimestre gestacional, assim como de ovários de abatedouros ou morte súbita (Galli et al., 2003). Também, o uso desta técnica tem ganhado força e aplicabilidade comercial principalmente com o uso do sêmen sexado e da seleção genômica (Sirard, 2018). Em relação a transferência dos embriões, os de origem *in vivo* vem reduzindo a utilização ao contrário dos *in vitro*. Atualmente aproximadamente 400 mil embriões *in vitro* no mundo são transferidos e desses 80% são transferidos à frescos (Viana, 2019).

A alta porcentagem do uso da transferência à fresco deve-se a qualidade inferior e a menor criotolerância desses embriões comparado aos *in vivo* (Rizos et al., 2002; Sudano et al., 2012). Essa menor criotolerância está relacionada principalmente ao maior acúmulo de lipídeos no citoplasma do embrião (Sudano et al., 2011). Porém, o número de embriões transferidos criopreservados/reaquecidos vem aumentando em consequência do progresso na formulação dos meios de cultivo que promovem uma melhor qualidade dos embriões (Galli et al., 2003). Dentre as alterações está a redução ou ausência do soro fetal bovino, a adição de antioxidantes e de aditivos embriotróficos.

Em geral, de 20 a 40% dos presumíveis zigotos chegam ao estágio de blastocisto no dia 7 do cultivo embrionário (Lonergan et al., 2001; Rizos et al., 2008). Essa taxa pode estar relacionada a incompleta maturação citoplasmática do ovócito, a condições inadequadas do

cultivo e a falha na ativação do genoma embrionário (Sirard et al., 2006). A menor qualidade atribuída aos embriões *in vitro* acaba refletindo na taxa de estabelecimento e manutenção da prenhez que em média é de 40% (Ealy et al., 2019; Reese et al., 2020). Fatores como a competência do embrião morfofuncional, celular e molecular são responsáveis por essas taxas (Marisco et al., 2019).

Por isso, um dos fatores determinantes para o sucesso da PIV é a capacidade do embriologista selecionar para transferência somente os embriões de melhor qualidade. Até o momento, o principal método para selecionar embriões é baseado nos aspectos morfológicos, mas esta informação pouco nos diz sobre a capacidade do embrião de induzir uma gestação. Portanto, a busca por métodos mais acurados tem sido o foco de muitos estudos, principalmente na área humana. Vários métodos tem sido relatados na literatura para avaliar a qualidade dos embriões, sendo eles classificados como métodos não invasivos e invasivos.

2.1 Métodos não invasivos

A seleção dos embriões por métodos não invasivos é baseada principalmente na morfologia, morfocinética, consumo de oxigênio, e em metabólitos (glicose, piruvato aminoácidos) e/ou outro marcadores presentes no meio de cultivo

2.1.1 Morfologia

A seleção morfológica dos embriões por microscopia é rápida, simples, não invasiva e de baixo custo, mas com a grande desvantagem de ser uma avaliação subjetiva que pouco nos informa sobre a capacidade de estabelecer a gestação (Zhao et al., 2013). Embriões no estágio de blastocisto podem receber a mesma classificação morfológica, mas podem diferir em várias outras características, as quais são responsáveis pela qualidade real do embrião, e pelos resultados de gestação (Cortezzi et al., 2013; Fu et al., 2013; Krisher et al., 2015).

Em bovinos a avaliação morfológica é realizada no dia sete do desenvolvimento embrionário, sendo os embriões classificados quanto ao estágio de desenvolvimento de mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido. Além disso, são avaliados pela morfologia em aspectos tais como tamanho, cor, quantidade de células extrusas, compactação do botão embrionário, entre outros, conforme o manual da sociedade de internacional de tecnologia de embriões (IETS), capítulo 9 e imagens no apêndice D (Bó, G. e Mapletoft, R., 2013). Essa mesma avaliação morfológica associada a alguns aspectos morfocinéticos associados a velocidade de desenvolvimento também tem sido utilizada rotineiramente para avaliar os embriões produzidos *in vitro*. Entretanto, as taxas de prenhez é em média menos de 50%, mostrando que essa avaliação

ainda tem limitações na seleção de embriões para transferência de embriões (Pontes et al., 2011; Ealy et al., 2019, Jaguszeski et al., 2019; Reese et al., 2020 e Lacerda et al., 2020).

2.1.2 Morfocinética

A seleção morfocinética avalia e correlaciona o desenvolvimento embrionário no tempo de cultivo. Essa seleção pode ser realizada pelo embriologista através da observação em microscópio estereoscópio ou com a utilização do microscópio com tecnologia *Time Lapse*. Essa tecnologia possibilita acompanhar, em tempo real, os embriões desde o estágio de zigoto até blastocisto, sem removê-los da incubadora e evitando expô-los a condições de estresse de exposição a luz, alteração de temperatura e pH. Nessa técnica os embriões são cultivados em estufas acopladas a um microscópio, o que permite a observação contínua dessas estruturas (Montag et al., 2013). A análise nesse sistema é realizada por observações retrospectivas do tempo de cada divisão do desenvolvimento do embrião, que é analisado por *softwares* e os dados são correlacionados com o sucesso da implantação e/ou aneuploidias em embriões humanos (Meseguer et al., 2011; Rubio et al., 2014).

Em humanos, o tempo de cada evento é computado a partir da injeção intracitoplasmática do espermatozoide (ICSI) sendo o intervalo de tempo entre a primeira e segunda divisão (cc1) e, entre a segunda e terceira (cc2) relacionados positivamente com a implantação (Meseguer et al., 2011). O intervalo entre a terceira e quarta (s2) e entre a terceira e quinta divisão (cc3) também estão caracterizados. Estes tempos geram algoritmos que contribuem para classificar e selecionar os embriões humanos (Meseguer et al., 2011).

Observações morfocinéticas incluindo taxa de clivagem, fusão dos pró-núcleos, tempo de extrusão do segundo corpúsculo polar, número e uniformidade dos blastômeros, expansão da blastocela, número de células da massa celular interna e simetria são obtidas com a utilização desse sistema (Perkel et al., 2015). A morfocinética tem sido amplamente utilizada nos laboratórios de reprodução assistida de humanos, pois estudos relatam que os algoritmos gerados aumentam a taxa de nascimento comprovando a eficácia de técnica (Meseguer et al., 2011; Armstrong et al., 2014; Rubio et al., 2014). Entretanto, Goodman et al., (2016) e Chen et al., (2017), em estudo clínico randomizado e em estudo de meta-análise, respectivamente, concluíram que atualmente não há evidências suficientes para sustentar que o *time lapse* seja superior aos métodos convencionais de seleção de embriões humanos (avaliação morfológica). Portanto, mesmo sendo utilizada em todas as clínicas de reprodução humana, estudos mais

delineados ainda precisam ser realizados para avaliar, de forma abrangente, a eficácia do uso clínico do *time lapse* (Goodman et al., 2016; Chen et al., 2017).

Em bovinos, utilizando *time lapse* alguns parâmetros como o tempo da primeira clivagem, número de blastômeros ao final da primeira clivagem e no início da fase log, foram associados com o aumento da taxa de prenhez quando comparada ao sistema convencional de seleção (Sugimura et al. 2017). Porém, em animais, o uso do *time lapse* ainda está sendo utilizado mais na área da pesquisa e ainda não existem parâmetros suficientes para estabelecer um sistema eficiente.

Entretanto, em bovinos, existe uma alta correlação da velocidade de desenvolvimento embrionário com a taxa de gestação, sendo os blastocistos expandidos aqueles que apresentam os maiores índices de gestação quando comparado com blastocistos e mórula (Lacerda et al. 2020; Jaguszeski et al., 2020). Além disso, existe relação da quantidade de células no momento das primeiras clivagens com a maior probabilidade de desenvolver à blastocisto, sendo os que possuem mais de 4 células as 40 horas possuem maior probabilidade comparada aos que apresentam duas células (Milazzotto et al., 2016).

2.1.3 Consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio tem sido considerado um indicador metabólico, pois reflete a atividade da fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS) que sintetiza a adenosina trifosfato (ATP) e, por isso, a sua utilização para auxiliar na seleção dos embriões tem sido sugerida. Houghton et al. (1996), utilizando um composto benzoico não tóxico que perde a fluorescência ao entrar em contato com o oxigênio, observaram um aumento no consumo de oxigênio durante o desenvolvimento embrionário de camundongos. Seguindo essa ideia, Kurosawa et al., (2016), utilizaram um *chip-sensing embryo respiration monitoring system* (CERMs) e mostraram que a taxa de consumo de oxigênio é significativamente maior em embriões humanos que atingem o estágio de blastocisto quando comparado aos que não se desenvolvem. Fato curioso foi de que alguns blastocistos com morfologia considerada boa, apresentaram baixo consumo de oxigênio, confirmando assim, que a morfologia nem sempre corresponde com um maior ou menor consumo deste biomarcador (Kurosawa et al., 2016).

Além desses métodos, o consumo de oxigênio em cultivo individual de embriões bovinos também já foi realizado utilizando um *scanning electrochemical microscopy* (SECM). Os resultados mostraram uma forte correlação entre o consumo de oxigênio e a morfologia do embrião bovino no estágio de mórula. Também, foi observado que quanto maior o consumo de

oxigênio no estágio de mórula, maior a probabilidade das estruturas formarem blastocisto (Shiku et al., 2001). Entretanto, nenhum estudo associou o resultado obtido desse equipamento com a taxa de gestação.

O consumo de oxigênio como um parâmetro isolado não é capaz de prever as taxas de implantação (Tejera et al., 2012). O próprio meio de cultivo em condições subótimas pode reduzir o consumo de oxigênio, resultando em uma falsa resposta. Isso, foi observado no estudo realizado por Magnusson et al., (1986), onde os blastocistos foram divididos em grupos contendo estruturas morfológicamente saudáveis e blastocistos degenerados e nenhuma diferença foi encontrada quanto ao consumo de oxigênio (Magnusson et al., 1986).

2.1.4 Metabolômica do embrião

A metabolômica é uma nova abordagem dentro da plataforma “omics” que visa identificar e quantificar um conjunto de metabólitos presentes na amostra em estudo sem ser invasiva ao embrião (Uyar e Seli, 2014). O metabolismo tem duas funções definidas, a primeira é fornecer energia necessária para as células manterem a homeostase intracelular e realizar funções especializadas, e a segunda é fornecer metabólitos para a biossíntese dos constituintes celulares (Henry, 2012). Portanto, a análise do metabolismo do embrião pela mensuração das mudanças de metabólitos no meio de cultivo pode refletir a viabilidade ou o estado fisiológico do embrião, sendo considerados embriões de boa qualidade aqueles que consomem e produzem poucos substratos e metabólitos quando comparado aos embriões de menor qualidade o que é conhecido como a teoria do embrião quieto (Henry, 2012).

Neste contexto, a avaliação por técnica fluorimétrica de metabólitos tais como o piruvato, lactato, glicose e aminoácidos presentes no meio de cultivo pode ser utilizada para selecionar os embriões mais saudáveis (Seli et al., 2010). No entanto, ainda não se tem identificado nenhum metabólito ou conjunto de metabólitos que possam ser utilizados para prever com segurança a qualidade dos embriões (Gardner et al., 2011; Ajduk e Zernicka-Goetz, 2012; Ajduk e Zernicka-Goetz, 2013).

Dentre os metabólitos, o piruvato é a principal fonte de substrato energético utilizado pelos embriões (Gardner et al. 2000; Leese et al., 2012). O metabolismo do piruvato está diretamente relacionado ao suporte energético das primeiras divisões celulares, devido à limitada capacidade do embrião utilizar glicose nesta fase (Leese e Gardner, 1999). Esta incapacidade deve-se as altas taxas de ATP:ADP que inibem o fluxo de glicose através da fosfofrutoquinase (Gardner e Harvey, 2015). Nesta fase, a função primária do piruvato é converter à lactato, regenerando o NAD^+ para então ser utilizado na glicólise, quando em

condições de anaerobiose (Lane e Gardner 2011). Semelhante ao piruvato, o lactato também é utilizado pelos embriões durante as primeiras divisões celulares. O meio de cultivo contendo maiores concentrações de lactato disponíveis durante a etapa das primeiras clivagens aumenta a viabilidade embrionária, da mesma forma quando há menor concentração no meio durante a fase de blastocisto (Lane e Gardner, 2000; Lesse et al., 2008; Gardner et al., 2000; Gardner 2011). Esta diferença na concentração de lactato no meio está relacionado ao metabolismo glicolítico e oxidativo fisiológico do embrião (Gardner e Harvey, 2015).

Já o maior consumo da glicose durante a transição de mórula para blastocisto está relacionado com o sucesso e desenvolvimento do embrião. Neste momento, os níveis de ATP:ADP reduzem aumentando a atividade da enzima fosfofrutoquinase favorecendo o fluxo glicolítico. Isso ocorre devido à alta demanda energética principalmente para a proliferação celular, expansão da blastocela, síntese de triacilglicerol e metabolismo da via pentose fosfato (PPP) (Gardner et al., 2011). O maior consumo de glicose em humanos no D4 está relacionado ao aumento das taxas de implantação e ao metabolismo de embrião fêmea (Gardner e Wale, 2013).

Os aminoácidos são precursores biosintéticos, ajudam na regulação da osmolaridade, são antioxidantes, servem de suprimento energético para o desenvolvimento embrionário. Portanto, o *turnover* de alguns aminoácidos presentes no meio de cultivo de embriões humanos, como glicina, leucina e asparagina, estão relacionados com as taxas de implantação e nascimento (Perkel et al., 2015). Os aminoácidos não essenciais promovem o desenvolvimento do embrião nos estágios de clivagem até blastocisto, aumentando o número de células do trofoblasto e aumentando a capacidade do embrião de eclodir. Já os essenciais, aumentam principalmente a taxa de divisão da massa celular interna, aumentando assim a capacidade do embrião de se desenvolver após a implantação (Gardner e Harvey, 2015). A presença de aminoácidos no meio de cultivo está fortemente relacionada com o desenvolvimento embrionário, sendo que a hipótese do embrião “quieto” sugere que embriões com menor alteração metabólica são classificados como mais viáveis por apresentarem menos alteração genômica, transcriptômica e proteômica (Leese et al., 2008).

Dentre os aminoácidos, a glutamina atua na pré-implantação dos embriões e é importante para a proliferação celular, síntese de proteínas, incluindo a manutenção da energia celular, do equilíbrio ácido-base e da síntese de aminoácidos, lipídeos e ácidos nucleicos (Chen et al., 2018). A metionina também tem um papel indispensável na reprodução e desenvolvimento

embrionário, pois é responsável por iniciar a síntese proteica e contribuindo nas reações de metilação do DNA, RNA, proteínas (Menezo et al., 2018).

Ainda com relação aos aminoácidos, o aumento nas taxas de implantação e nascimento em humanos foram associados com o consumo dos níveis de glicina, leucina e asparagina no meio de cultivo (Brison et al., 2004). Já a formação do blastocisto foi relacionada ao consumo de alanina, arginina, glutamina, metionina e asparagina nos dias dois e três (Houghton et al., 2002). O consumo de asparagina, glicina e valina também tem sido utilizado para identificar embriões com aneuploidias (Picton et al., 2010). Em bovinos, tem sido relatado um maior consumo de aspartato, serina e maior produção de alanina, piroglutamato / glutamina / glutamato e piruvato no meio de cultivo (Krisher et al., (2015).

Enfim, o estudo da metabolômica fornece informações sobre as vias bioquímicas que o embrião utiliza, sob diferentes condições de cultivo o que possibilita a manipulação do sistema de produção *in vitro*, melhorando a qualidade dos embriões transferidos, aumentando as taxas de implantação (Krisher et al., 2015).

2.1.5 Técnicas de análises metabolômicas

Algumas técnicas podem ser utilizadas para analisar o metabolismo do embrião por meio da avaliação do meio de cultivo como: *proton nuclear magnetic resonance* ($^1\text{H-NMR}$), *near infrared spectroscopy* (NIR), Raman, *infrared radiation* (IR) e a espectrometria de massa (MS) acoplada ou não a cromatografia gasosa (GC) e/ou líquida (LC).

O $^1\text{H-NMR}$ é uma ferramenta de análise não destrutiva que permite a detecção e quantificação de metabólitos específicos em fluidos biológicos ou tecidos, sendo utilizada para identificação de biomarcadores. Entretanto, apresenta algumas limitações que são atribuídos à necessidade de um grande volume amostral, alto custo e falta de sensibilidade em amostras com baixa quantidade de metabólitos, favorecendo o uso desse método apenas para material com alta concentração das moléculas alvo (Perkel et al., 2015). Utilizando essa técnica, Marhuenda-Egea et al., (2010), encontraram diferenças nos perfis metabólicos entre o meio de cultivo de embriões humanos que geram ou não prenhez. Da mesma forma, Seli et al., (2007), também encontraram um aumento de glutamato no meio de cultivo de embriões humanos que implantaram e nasceram. Já em bovinos essa técnica foi utilizada para avaliação do metaboloma do fluido do oviduto pré e pós ovulação, em que 39 compostos foram identificados sendo a glicina, lactato e myo-inositol encontrados em ambos períodos (Lamy et al.2018).

Já o uso da espectroscopia NIR que também detecta diversos metabólitos, permite uma análise não destrutiva da amostra, não requerendo preparo e separação da amostra. Quando utilizada para avaliação do meio de cultivo os espectros resultantes correspondem a vibração dos grupos funcionais (N-H; C-H, O-H e S-H) e a concentração dos compostos é determinada pela absorvância entre 920-1675 nm (Seli et al.,2010). Estudos conduzidos por Vergouw et al., (2008) sugeriram que o perfil metabólico obtido por NIR era uma ferramenta viável para distinguir o meio de cultivo dos embriões que resultavam ou não em prenhez. Entretanto, Hardarson et al, (2011) observaram que a espectroscopia NIR não foi melhor que a avaliação morfológica. Interessante ressaltar que Vergouw e colaboradores (2012 e 2014) em estudos posteriores aos de 2008, também concluíram que realizar a análise do meio de cultivo por espectroscopia NIR não aumenta a taxa de nascimento comparado a avaliação morfológica, sendo seu uso dispensável para esse tipo de parâmetro (Vergouw et al., 2008; Vergouw et al., 2012; Vergouw et al., 2014).

Outra técnica utilizada para avaliação dos metabólitos é o Raman, sendo uma técnica com alta sensibilidade, requer pouco volume amostral, não destrutiva, porém não permite a determinação direta do metabólito (Seli et al., 2010; Huang et al., 2013; Santos et al., 2015). Diferente do NIR, o IR é resultado da absorção da radiação eletromagnética pela vibração das moléculas onde as amostras são expostas ao feixe infravermelho (Uyar e Seli, 2014). Estudos utilizando a técnica Raman diferenciaram os perfis do meio de cultivo de embrião bovino produzido *in vitro* com e sem estrutura e, concluíram que os perfis podem estar correlacionados com uma futura indicação de viabilidade dos embriões (Santos et al., 2015). Também pela técnica de Raman, Seli et al., (2007) verificaram uma sensibilidade de 85,7% e uma especificidade de 76,5% quando correlacionaram os resultados adquiridos do meio de cultivo de embriões humanos com a gestação.

Semelhante ao NIR, a espectrometria de massa (MS) é capaz de detectar diversos metabólitos, requer pouco volume amostral, permite a identificação direta do material analisado, possui alta sensibilidade e especificidade. A sensibilidade dessa técnica pode ainda ser aumentada quando utilizada em conjunto com a técnica de cromatografia líquida ou gasosa. A cromatografia líquida possui uma alta reprodutividade, enquanto a cromatografia gasosa, é altamente eficiente para detectar e quantificar metabólitos de baixo peso molecular capazes de atingir níveis de volatilização (Perkel et al., 2015). A sensibilidade da MS permite a avaliação individual do material eliminando a necessidade de *pools*, permitindo associar, por exemplo, os perfis metabólicos com a competência dos embriões após a transferência (Muñoz et al., 2014; Krisher et al., 2015).

As principais informações geradas com as análises metabólicas pela técnica de MS estão relacionadas ao consumo e produção de aminoácidos no meio de cultivo (Brison et al., 2004; Marhuenda-Egea et al., 2010; Krisher et al., 2015; Drábková et al., 2016; Nõmm et al., 2019). A natureza complexa do meio de cultivo do embrião, assim como o baixo volume de amostra disponível, torna os métodos de espectrometria de massa ideais para este fim, nos quais os metabólitos são identificados com base na sua propriedade química (Seli et al., 2007; Cortezzi et al., 2013; Zhao et al., 2013; Muñoz et al., 2014; Uyar e Seli, 2014; Vergouw et al., 2014; Krisher et al., 2015).

Também a espectrometria de massa possui dois tipos de ionização a MALDI (*matrix assisted laser desorption*) e ESI (*eletrospray*). Estudos realizados com MALDI-MS identificaram a presença de triglicerídeos (TAG), fosfatidilcolinas (PC) e esfingomielinas (SM) em embriões bovinos, assim como diferentes perfis lipídicos tem sido encontrado quando compararam embriões *in vivo* de *in vitro*, fresco e reaquecido e de *taurus* e *indicus*. (Sudano et al., 2012; Tata et al., 2013; Leão et al., 2015; Sprícigo et al., 2015; Leão et al., 2017). Também utilizando esta técnica, Krisher et al., (2015) avaliaram os embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* de diferentes espécies (humanos, camundongos, suínos e bovinos), e observaram o *turnover* dos aminoácidos entre cada embrião *in vivo* e *in vitro* de cada espécie, sendo arginina, asparagina, aspartato, pyroglutamato/glutamina/glutamato, serina e prolina os principais aminoácidos consumidos e alanina, pyroglutamato/glutamina/glutamato e lisina os aminoácidos produzidos. Porém, em todos estes estudos, os embriões foram utilizados para as análises, o que acaba inutilizando o embrião.

Já o uso da ionização por *eletrospray*, normalmente vem acoplada a sistemas de análises LC-ESI-MS/MS, o que proporciona um resultado muito fidedigno do material analisado devido à alta especificidade da análise. Dentre os estudos que utilizam essa técnica, pode-se destacar análises proteômicas em estudos descritivos de caracterização proteica, que buscam estabelecer biomarcadores proteicos (Katz-Jaffe et al., 2009; Seli et al., 2010).

Em humanos, Domínguez et al., (2008) compararam o perfil proteico do meio de cultivo de blastocistos viáveis que geraram ou não gestação e concluíram que esta ferramenta de análise pode ser utilizada para diagnosticar a viabilidade embrionária. Enquanto em bovinos, Jensen et al., (2014) identificaram proteínas relacionadas a diferenciação, proliferação, desenvolvimento e reprodução nos blastocistos e no líquido da blastocele. Também, Demant et al., (2015) identificaram 140 proteínas que foram diferencialmente expressas entre mórulas e blastocistos produzidos *in vitro*. Da mesma forma, Balian et al., (2020) identificaram 13

proteínas exclusivas do estágio de 4-6 células, 19 proteínas exclusivas de mórulas e 24 proteínas que interagem os estágios embrionários.

2.2 Métodos invasivos

A seleção dos embriões por métodos invasivos está relacionada a técnicas que utilizam uma parte ou todo o embrião, como fonte de material biológico. Em alguns como, por exemplo, algumas colorações específicas inutilizam o embrião, enquanto em outros apenas parte do embrião é removida. Nesses casos uma biópsia ou o LB, são utilizados para diversos tipos de avaliações bioquímicas.

2.2.1 Níveis de transcritos

Uma das maneiras de avaliar a qualidade do embrião é avaliar a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento pré-implantacional e gestação (Niemann e Wrenzycki, 2000). Isso porque os genes importantes para o desenvolvimento embrionário no estágio de blastocisto são expressos diferentemente quando se compara embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro* (El-Sayed et al., 2006; Ghanem et al., 2011; Machado et al., 2013).

A avaliação da expressão gênica exige o uso do próprio embrião ou uma biópsia. A biópsia é muito utilizada em embriões humanos para avaliar ploidias (Jiang et al., 2019; Kemper et al., 2019; Victor et al., 2019). Enquanto em animais o foco é identificar marcadores moleculares que possam selecionar embriões de melhor qualidade, isso porque a variação na expressão entre os genes envolvidos no desenvolvimento do blastocisto pode explicar, em parte, essas diferenças na qualidade desses embriões. Portanto, a identificação de mudanças no perfil de genes relacionados ao desenvolvimento do embrião pode refletir a condição fisiológica e conseqüentemente a qualidade. Porém, para identificar genes marcadores é necessário, inicialmente prospectar e, depois validar os genes alvos.

Técnicas que prospectam genes como o microarranjo e RNA-Seq tem sido alvo de estudos na tentativa de identificar genes marcadores. A técnica de microarranjo consegue avaliar milhares de genes simultaneamente (Gad et al., 2012; Ajduk e Zernicka-Goetz, 2013), já o sequenciamento de RNA (RNA-Seq) avalia o perfil transcriptômico (todos os genes) e usa tecnologias de amplo-sequenciamento.

Utilizando microarranjo, Corcoran et al., (2006) mostraram que embriões bovinos *in vitro* são de qualidade inferior aos *in vivo*, pois existe uma deficiência no mecanismo associado à transcrição e tradução. Da mesma forma, El-Sayed et al., (2006) e Ghanem et al., (2011),

avaliaram o perfil de expressão gênica e associaram com a taxa de implantação. O interessante desses dois trabalhos é que seus resultados foram comparados e com isso foi possível identificar o mesmo perfil de genes relacionados à gestação entre embriões *in vivo* e *in vitro*. Dentre os genes validados, o H2FAZ, BMP15, TXN, PTGS2, PLAC8, B2M estavam *downregulated* em embriões que não estabeleceram gestação e os genes PTTG1, RPL3, RPS15A, EEF1A1, CD9, HSPD1, S100A14, AKR1B1, TNF, FL405, FI396, NADH estavam *upregulated*. Já, estudos avaliando o transcriptoma de embriões bovinos por com RNA-Seq revelaram que a maioria dos genes que estavam *upregulated* em blastocistos produzidos *in vivo* eram relacionados aos processos de redução de oxidação, organização mitocondrial e tradução mitocondrial. Da mesma forma que a quantidade mitocondrial e o conteúdo de ATP foram menores em blastocistos *in vivo* comparado aos *in vitro*. (Noguchi et al., 2020).

Com base nesses estudos vários genes identificados tem sido utilizado como marcadores por diversos autores. Os genes que estão envolvidos com a qualidade dos embriões bovinos como PLAC8, KRT8, HSPB1, CD9, PAG2, MSH6, foram avaliados e quantificados por qPCR por Diógenes et al., (2017), mostrando similaridade na expressão dos genes de embriões quando o FGF10 foi adicionado na maturação. Outros genes como Mn-SOD, GPX, IFN- τ foram comparados entre embriões cultivados em alta ou baixa tensão de O₂, sendo o MnSOD mais expresso quando os embriões foram cultivados na alta tensão (Corrêa et al., 2008). Já os genes PLAC8, KRT8, CD9, SLC2A1, SLC2A3, PGK1, HSF1, MNSOD, HSP70, IFNT foram avaliados em embriões *in vivo* e *in vitro* no D14, sendo o HSP70 menos expresso e o SLC2A1 mais expresso nos embriões *in vitro* (Machado et al., 2013). Já os genes SOD2 e HSPB1 foram menos expressos nos embriões quando a melatonina foi adicionada durante a maturação (Marques et al., 2018).

Apesar de muitos estudos utilizarem a expressão gênica como avaliação embrionária, ainda não se tem dados suficientes em relação ao padrão de expressão desses genes para que se possa estabelecer um sistema capaz de selecionar embriões de melhor qualidade.

2.2.2 Líquido da blastocele (LB)

Apesar de recentes avanços no uso das “OMICs” a função e composição do LB não estão totalmente esclarecidos. As principais limitações desse tipo de estudo é a dificuldade de obtenção do LB, somados ao pouco volume obtido por amostra (menos de 0,01 μ L). Por outro lado, a espectrometria de massa, que possibilita a utilização de volumes muito pequenos e identifica metabólitos em baixas concentração, abre novas possibilidade para estudos do LB.

Com a descoberta da presença do material genético (DNA) no LB de embriões humanos (Palini et al., 2013), somados a outros estudos que também demonstraram que o DNA pode ser isolado, amplificado e quantificado do LB, este torna-se mais uma alternativa para a realização de testes genéticos pré-implantacionais (Tobler et al., 2015; Hammond et al., 2016; Magli et al., 2016; Zhang et al., 2016; Rule et al., 2018). Estudos mostram que por ser uma nova abordagem, alguns esclarecimentos ainda são necessários e que por isso sua utilização ainda não é recomendada para a realização de triagem genética pré-implantacional (Kuznyetsov et al., 2018; Li et al., 2018; Tšuiiko et al., 2018).

Já a maioria dos estudos sobre o LB em animais domésticos estão relacionados à processos de criopreservação, pois a presença deste líquido desfavorece a taxa de sobrevivência do embrião devido à formação de cristais de gelo durante este procedimento (Vajta e Kuwayama, 2006). Estes estudos envolvem a remoção do líquido da blastocèle antes dos processos de criopreservação, e já foram realizado em embriões bovinos (Min et al., 2014; Marques et al., 2018), equinos (Diaz et al., 2016), murinos (Kazemi et al., 2016) e felinos (Ochota et al., 2017). Já os estudos sobre a composição do LB permanecem escassos, apesar das concentrações de glicose, piruvato e lactato já terem sido relatadas em ratos (Brison et al., 1993) e em bovinos (Gopichandran e Leese, 2003). Este último trabalho também verificou os aminoácidos no LB por cromatografia líquida. Outro estudo com embriões bovinos que verificou a proteômica do LB identificou proteínas que podem ser utilizadas para a melhor compreensão da pluripotência e desenvolvimento embrionário (Jensen et al., 2014).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ajduk, A. and M. Zernicka-Goetz (2012). "Advances in embryo selection methods." F1000 biology reports **4**: 11-11.
- Ajduk, A. and M. Zernicka-Goetz (2013). "Quality control of embryo development." Molecular Aspects of Medicine **34**(5): 903-918.
- Armstrong, S., A. Vail, S. Mastenbroek, V. Jordan and C. Farquhar (2014). "Time-lapse in the IVF-lab: how should we assess potential benefit?" Human Reproduction **30**(1): 3-8.
- Bo, G. and R. Mapletoft (2013). "Evaluation and classification of bovine embryos." Animal Reproduction **10**: 344-348.
- Brison, D. R., L. C. Hewitson and H. J. Leese (1993). "Glucose, pyruvate, and lactate concentrations in the blastocoel cavity of rat and mouse embryos." Molecular Reproduction and Development **35**(3): 227-232.
- Brison, D. R., F. D. Houghton, D. Falconer, S. A. Roberts, J. Hawkhead, P. G. Humpherson, B. A. Lieberman and H. J. Leese (2004). "Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover." Human Reproduction **19**(10): 2319-2324.
- Chen, M., S. Wei, J. Hu, J. Yuan and F. Liu (2017). "Does time-lapse imaging have favorable results for embryo incubation and selection compared with conventional methods in clinical in vitro fertilization? A meta-analysis and systematic review of randomized controlled trials." PloS one **12**(6): e0178720.
- Chen, P. R., B. K. Redel, L. D. Spate, T. Ji, S. R. Salazar and R. S. Prather (2018). "Glutamine supplementation enhances development of in vitro-produced porcine embryos and increases leucine consumption from the medium." Biology of Reproduction **99**(5): 938-948.
- Corrêa, G. A., R. Rumpf, T. C. D. Mundim, M. M. Franco and M. A. N. Dode (2008). "Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress." Animal Reproduction Science **104**(2): 132-142.
- Cortezzi, S. S., E. C. Cabral, M. G. Trevisan, C. R. Ferreira, A. S. Setti, D. P. d. A. F. Braga, R. d. C. S. Figueira, A. Iaconelli, M. N. Eberlin and E. Borges (2013). "Prediction of embryo implantation potential by mass spectrometry fingerprinting of the culture medium." **145**(5): 453.

- Diaz, F., K. Bondioli, D. Paccamonti and G. T. Gentry (2016). "Cryopreservation of Day 8 equine embryos after blastocyst micromanipulation and vitrification." Theriogenology **85**(5): 894-903.
- Drábková, P., L. Andrlová, R. Hampl and R. Kand'ár (2016). "Amino Acid Metabolism in Human Embryos." Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca **65**.
- Ealy, A. D., L. K. Wooldridge and S. R. McCoski (2019). "BOARD INVITED REVIEW: Post-transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle." Journal of Animal Science **97**(6): 2555-2568.
- El-Sayed, A., M. Hoelker, F. Rings, D. Salilew, D. Jennen, E. Tholen, M.-A. Sirard, K. Schellander and D. Tesfaye (2006). "Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients." Physiological Genomics **28**(1): 84-96.
- Ferré, L. B., M. E. Kjelland, A. M. Taiyeb, F. Campos-Chillon and P. J. Ross (2020). "Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: Impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations." Reproduction in Domestic Animals **55**(6): 659-676.
- Gad, A., M. Hoelker, U. Besenfelder, V. Havlicek, U. Cinar, F. Rings, E. Held, I. Dufort, M.-A. Sirard, K. Schellander and D. Tesfaye (2012). "Molecular Mechanisms and Pathways Involved in Bovine Embryonic Genome Activation and Their Regulation by Alternative In Vivo and In Vitro Culture Conditions1." Biology of Reproduction **87**(100, 1-13).
- Galli, C., R. Duchi, G. Crotti, P. Turini, N. Ponderato, S. Colleoni, I. Lagutina and G. Lazzari (2003). "Bovine embryo technologies." Theriogenology **59**(2): 599-616.
- Gardner, D. K. and A. J. Harvey (2015). "Blastocyst metabolism." Reproduction, Fertility and Development **27**(4): 638-654.
- Gardner, D. K. and P. L. Wale (2013). "Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer." Fertility and Sterility **99**(4): 1062-1072.
- Gardner, D. K., P. L. Wale, R. Collins and M. Lane (2011). "Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome." Human reproduction (Oxford, England) **26**(8): 1981-1986.
- Ghanem, N., D. Salilew-Wondim, A. Gad, D. Tesfaye, C. Phatsara, E. Tholen, C. Looft, K. Schellander and M. Hoelker (2011). "Bovine blastocysts with developmental competence to term share similar expression of developmentally important genes although derived from different culture environments." Reproduction **142**(4): 551-564.
- Goodman, L. R., J. Goldberg, T. Falcone, C. Austin and N. Desai (2016). "Does the addition of time-lapse morphokinetics in the selection of embryos for transfer improve pregnancy rates? A randomized controlled trial." Fertility and Sterility **105**(2): 275-285.e210.
- Gopichandran, N. and H. Leese (2003). "Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid." Reproduction (Cambridge, England) **126**: 299-308.

- Hammond, E. R., A. N. Shelling and L. M. Cree (2016). "Nuclear and mitochondrial DNA in blastocoele fluid and embryo culture medium: evidence and potential clinical use." Human Reproduction **31**(8): 1653-1661.
- Henry, J. L. (2012). "Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on." Reproduction **143**(4): 417-427.
- Houghton, F. D., J. A. Hawkhead, P. G. Humpherson, J. E. Hogg, A. H. Balen, A. J. Rutherford and H. J. Leese (2002). "Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity." Human Reproduction **17**(4): 999-1005.
- Katz-Jaffe, M. G., S. McReynolds, D. K. Gardner and W. B. Schoolcraft (2009). "The role of proteomics in defining the human embryonic secretome." Molecular Human Reproduction **15**(5): 271-277.
- Kazemi, P., M. Dashtizad, M. Shamsara, F. Mahdavinezhad, E. Hashemi, S. Fayazi and H. Hajarian (2016). "Effect of blastocoele fluid reduction before vitrification on gene expression in mouse blastocysts." Molecular Reproduction and Development **83**(8): 735-742.
- Krisher, R. L., A. L. Heuberger, M. Paczkowski, J. Stevens, C. Pospisil, R. S. Prather, R. G. Sturmey, J. R. Herrick and W. B. Schoolcraft (2015). "Applying metabolomic analyses to the practice of embryology: physiology, development and assisted reproductive technology." Reproduction, Fertility and Development **27**(4): 602-620.
- Krisher, R. L., W. B. Schoolcraft and M. G. Katz-Jaffe (2015). "Omics as a window to view embryo viability." Fertility and Sterility **103**(2): 333-341.
- Kurosawa, H., H. Utsunomiya, N. Shiga, A. Takahashi, M. Ihara, M. Ishibashi, M. Nishimoto, Z. Watanabe, H. Abe, J. Kumagai, Y. Terada, H. Igarashi, T. Takahashi, A. Fukui, R. Suganuma, M. Tachibana and N. Yaegashi (2016). "Development of a new clinically applicable device for embryo evaluation which measures embryo oxygen consumption." Human Reproduction **31**(10): 2321-2330.
- Kuznyetsov, V., S. Madjunkova, R. Antes, R. Abramov, G. Motamedi, Z. Ibarrientos and C. Librach (2018). "Evaluation of a novel non-invasive preimplantation genetic screening approach." PloS one **13**(5): e0197262-e0197262.
- Leão, B. C. S., N. A. S. Rocha-Frigoni, E. C. Cabral, M. F. Franco, C. R. Ferreira, M. N. Eberlin, P. R. Filgueiras and G. Z. Mingoti (2015). "Membrane lipid profile monitored by mass spectrometry detected differences between fresh and vitrified in vitro-produced bovine embryos." Zygote **23**(5): 732-741.
- Leão, B. C. S., N. A. S. Rocha-Frigoni, É. Nogueira, E. C. Cabral, C. R. Ferreira, M. N. Eberlin, M. F. Accorsi, T. V. Neves and G. Z. Mingoti (2017). "Membrane lipid profile of *in vitro*-produced embryos is affected by vitrification but not by long-term dietary supplementation of polyunsaturated fatty acids for oocyte donor beef heifers." Reproduction, Fertility and Development **29**(6): 1217-1230.

- Leese, H. J., C. G. Baumann, D. R. Brison, T. G. McEvoy and R. G. Sturmev (2008). "Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited." Molecular Human Reproduction **14**(12): 667-672.
- Li, P., Z. Song, Y. Yao, T. Huang, R. Mao, J. Huang, Y. Ma, X. Dong, W. Huang, J. Huang, T. Chen, T. Qu, L. Li, Y. Zhong and J. Gu (2018). "Preimplantation Genetic Screening with Spent Culture Medium/Blastocoel Fluid for in Vitro Fertilization." Scientific Reports **8**(1): 9275.
- Machado, G. M., A. R. Ferreira, I. Pivato, A. Fidelis, J. F. Spricigo, F. Paulini, C. M. Lucci, M. M. Franco and M. A. Dode (2013). "Post-hatching development of in vitro bovine embryos from day 7 to 14 in vivo versus in vitro." Molecular Reproduction and Development **80**(11): 936-947.
- Magli, M. C., A. Pomante, G. Cafueri, M. Valerio, A. Crippa, A. P. Ferraretti and L. Gianaroli (2016). "Preimplantation genetic testing: polar bodies, blastomeres, trophectoderm cells, or blastocoelic fluid?" Fertility and Sterility **105**(3): 676-683.e675.
- Magnusson, C., T. Hillensjö, L. Hamberger and L. Nilsson (1986). "Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown in vitro." Human Reproduction **1**(3): 183-184.
- Marhuenda-Egea, F. C., E. Martínez-Sabater, R. Gonsálvez-Álvarez, B. Lledó, J. Ten and R. Bernabeu (2010). "A crucial step in assisted reproduction technology: human embryo selection using metabolomic evaluation." Fertility and Sterility **94**(2): 772-774.
- Marques, T. C., E. C. da Silva Santos, T. O. Diesel, L. O. Leme, C. F. Martins, M. A. N. Dode, B. G. Alves, F. P. H. Costa, E. B. de Oliveira and M. L. Gambarini (2018). "Melatonin reduces apoptotic cells, SOD2 and HSPB1 and improves the in vitro production and quality of bovine blastocysts." Reproduction in Domestic Animals **53**(1): 226-236.
- Menezo, Y., B. Dale and K. Elder (2018). "Time to re-evaluate ART protocols in the light of advances in knowledge about methylation and epigenetics: an opinion paper." Human Fertility **21**(3): 156-162.
- Meseguer, M., J. Herrero, A. Tejera, K. M. Hilligsøe, N. B. Ramsing and J. Remohí (2011). "The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation†." Human Reproduction **26**(10): 2658-2671.
- Min, S. H., J. W. Kim, Y. H. Lee, S. Y. Park, P. S. Jeong, J. Y. Yeon, H. Park, K. T. Chang and D. B. Koo (2014). "Forced Collapse of the Blastocoel Cavity Improves Developmental Potential in Cryopreserved Bovine Blastocysts by Slow-Rate Freezing and Vitrification." Reproduction in Domestic Animals **49**(4): 684-692.
- Montag, M., B. Toth and T. Strowitzki (2013). "New approaches to embryo selection." Reproductive BioMedicine Online **27**(5): 539-546.
- Muñoz, M., A. Uyar, E. Correia, C. Díez, A. Fernandez-Gonzalez, J. N. Caamaño, D. Martínez-Bello, B. Trigal, P. Humblot, C. Ponsart, C. Guyader-Joly, S. Carrocera, D. Martin, B. Marquant Le Guienne, E. Seli and E. Gomez (2014). "Prediction of pregnancy viability in bovine in vitro-produced embryos and recipient plasma with Fourier transform infrared spectroscopy." Journal of Dairy Science **97**(9): 5497-5507.

Niemann, H. and C. Wrenzycki (2000). "Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: Implications for subsequent development." Theriogenology **53**(1): 21-34.

Noguchi, T., T. Aizawa, Y. Munakata and H. Iwata (2020). "Comparison of gene expression and mitochondria number between bovine blastocysts obtained *in vitro* and *in vivo*." The Journal of reproduction and development **66**(1): 35-39.

Nõmm, M., R. Porosk, P. Pärn, K. Kilk, U. Soomets, S. Kõks and Ü. Jaakma (2019). "In vitro culture and non-invasive metabolic profiling of single bovine embryos." Reproduction, fertility, and development **31**(2): 306-314.

Ochota, M., B. Wojtasik and W. Nizański (2017). "Survival rate after vitrification of various stages of cat embryos and blastocyst with and without artificially collapsed blastocoel cavity." Reproduction in Domestic Animals **52**(S2): 281-287.

Palini, S., L. Galluzzi, S. De Stefani, M. Bianchi, D. Wells, M. Magnani and C. Bulletti (2013). "Genomic DNA in human blastocoel fluid." Reproductive BioMedicine Online **26**(6): 603-610.
Patrick, L., R. Dimitrios, W. Fabian and P. B. Maurice (2001). "Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle." Reprod. Nutr. Dev. **41**(5): 427-437.

Perkel, K. J., A. Tscherner, C. Merrill, J. Lamarre and P. Madan (2015). "The ART of selecting the best embryo: A review of early embryonic mortality and bovine embryo viability assessment methods." Molecular Reproduction and Development **82**(11): 822-838.

Picton, H. M., K. Elder, F. D. Houghton, J. A. Hawkhead, A. J. Rutherford, J. E. Hogg, H. J. Leese and S. E. Harris (2010). "Association between amino acid turnover and chromosome aneuploidy during human preimplantation embryo development in vitro." Molecular Human Reproduction **16**(8): 557-569.

Reese, S. T., G. A. Franco, R. K. Poole, R. Hood, L. Fernandez Montero, R. V. Oliveira Filho, R. F. Cooke and K. G. Pohler (2020). "Pregnancy loss in beef cattle: A meta-analysis." Animal Reproduction Science **212**: 106251.

Rizos, D., M. Clemente, P. Bermejo-Alvarez, J. De La Fuente, P. Lonergan and A. Gutiérrez-Adán (2008). "Consequences of In Vitro Culture Conditions on Embryo Development and Quality." Reproduction in Domestic Animals **43**(s4): 44-50.

Rizos, D., T. Fair, S. Papadopoulos, M. P. Boland and P. Lonergan (2002). "Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro." Molecular Reproduction and Development **62**(3): 320-327.

Rubio, I., A. Galán, Z. Larreategui, F. Ayerdi, J. Bellver, J. Herrero and M. Meseguer (2014). "Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope." Fertility and Sterility **102**(5): 1287-1294.e1285.

Rule, K., R. J. Chosed, T. Arthur Chang, J. David Wininger and W. E. Roudebush (2018). "Relationship between blastocoel cell-free DNA and day-5 blastocyst morphology." Journal of Assisted Reproduction and Genetics **35**(8): 1497-1501.

- Santos, E. C., H. S. Martinho, K. Annes, R. F. Leite and M. P. Milazzotto (2015). "Rapid and noninvasive technique to assess the metabolomics profile of bovine embryos produced in vitro by Raman spectroscopy." Biomedical optics express **6**(8): 2830-2839.
- Seli, E., D. Sakkas, R. Scott, S. C. Kwok, S. M. Rosendahl and D. H. Burns (2007). "Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization." Fertility and Sterility **88**(5): 1350-1357.
- Seli, E., C. G. Vergouw, H. Morita, L. Botros, P. Roos, C. B. Lambalk, N. Yamashita, O. Kato and D. Sakkas (2010). "Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer." Fertility and Sterility **94**(2): 535-542.
- Shiku, H., T. Shiraishi, H. Ohya, T. Matsue, H. Abe, H. Hoshi and M. Kobayashi (2001). "Oxygen Consumption of Single Bovine Embryos Probed by Scanning Electrochemical Microscopy." Analytical Chemistry **73**(15): 3751-3758.
- Sirard, M.-A. (2018). "40 years of bovine IVF in the new genomic selection context." Reproduction **156**(1): R1.
- Sirard, M.-A., F. Richard, P. Blondin and C. Robert (2006). "Contribution of the oocyte to embryo quality." Theriogenology **65**(1): 126-136.
- Sprícigo, J. F. W., M. N. Diógenes, L. O. Leme, A. L. Guimarães, C. V. Muterlle, B. D. M. Silva, D. Solà-Oriol, I. Pivato, L. P. Silva and M. A. N. Dode (2015). "Effects of Different Maturation Systems on Bovine Oocyte Quality, Plasma Membrane Phospholipid Composition and Resistance to Vitrification and Warming." PloS one **10**(6): e0130164-e0130164.
- Sudano, M. J., D. M. Paschoal, T. da Silva Rascado, L. C. O. Magalhães, L. F. Crocomo, J. F. de Lima-Neto and F. da Cruz Landim-Alvarenga (2011). "Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification." Theriogenology **75**(7): 1211-1220.
- Sudano, M. J., V. G. Santos, A. Tata, C. R. Ferreira, D. M. Paschoal, R. Machado, J. Buratini, M. N. Eberlin and F. D. C. Landim-Alvarenga (2012). "Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* In Vitro- and In Vivo-Produced Blastocysts1." Biology of Reproduction **87**(130, 1-11).
- Sylvia Sanches, C., C. Elaine Cristina, T. Marcello Garcia, F. Christina Ramires, S. Amanda Souza, B. Daniela Paes de Almeida Ferreira, F. Rita de Cássia Sávio, I. Assumpto, E. Marcos Nogueira and B. Edson (2013). "Prediction of embryo implantation potential by mass spectrometry fingerprinting of the culture medium." Reproduction **145**(5): 453-462.
- Tata, A., M. J. Sudano, V. G. Santos, F. D. C. Landim-Alvarenga, C. R. Ferreira and M. N. Eberlin (2013). "Optimal single-embryo mass spectrometry fingerprinting." Journal of Mass Spectrometry **48**(7): 844-849.

- Tejera, A., J. Herrero, T. Vilorio, J. L. Romero, P. Gamiz and M. Meseguer (2012). "Time-dependent O₂ consumption patterns determined optimal time ranges for selecting viable human embryos." Fertility and Sterility **98**(4): 849-857.e843.
- Tobler, K. J., Y. Zhao, R. Ross, A. T. Benner, X. Xu, L. Du, K. Broman, K. Thrift, P. R. Brezina and W. G. Kearns (2015). "Blastocoel fluid from differentiated blastocysts harbors embryonic genomic material capable of a whole-genome deoxyribonucleic acid amplification and comprehensive chromosome microarray analysis." Fertility and Sterility **104**(2): 418-425.
- Tšuiiko, O., D. I. Zhigalina, T. Jatsenko, N. A. Skryabin, O. R. Kanbekova, V. G. Artyukhova, A. V. Svetlakov, K. Teearu, A. Trošin, A. Salumets, A. Kurg and I. N. Lebedev (2018). "Karyotype of the blastocoel fluid demonstrates low concordance with both trophectoderm and inner cell mass." Fertility and Sterility **109**(6): 1127-1134.e1121.
- Uyar, A. and E. Seli (2014). "Metabolomic assessment of embryo viability." Seminars in reproductive medicine **32**(2): 141-152.
- Vajta, G. and M. Kuwayama (2006). "Improving cryopreservation systems." Theriogenology **65**(1): 236-244.
- Vergouw, C. G., L. L. Botros, P. Roos, J. W. Lens, R. Schats, P. G. A. Hompes, D. H. Burns and C. B. Lambalk (2008). "Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection." Human Reproduction **23**(7): 1499-1504.
- Vergouw, C. G., M. W. Heymans, T. Hardarson, I. A. Sfontouris, K. A. Economou, A. Ahlström, L. Rogberg, T. G. Lainas, D. Sakkas, D. C. Kieslinger, E. H. Kosteljik, P. G. A. Hompes, R. Schats and C. B. Lambalk (2014). "No evidence that embryo selection by near-infrared spectroscopy in addition to morphology is able to improve live birth rates: results from an individual patient data meta-analysis." Human Reproduction **29**(3): 455-461.
- Vergouw, C. G., D. C. Kieslinger, E. H. Kosteljik, L. L. Botros, R. Schats, P. G. Hompes, D. Sakkas and C. B. Lambalk (2012). "Day 3 embryo selection by metabolomic profiling of culture medium with near-infrared spectroscopy as an adjunct to morphology: a randomized controlled trial." Human Reproduction **27**(8): 2304-2311.
- Viana, J. H. (2019). "2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals." Embryo Technology Newsletter **36**(4): 14.
- Zhang, Y., N. Li, L. Wang, H. Sun, M. Ma, H. Wang, X. Xu, W. Zhang, Y. Liu, D. S. Cram, B. Sun and Y. Yao (2016). "Molecular analysis of DNA in blastocoele fluid using next-generation sequencing." Journal of Assisted Reproduction and Genetics **33**(5): 637-645.
- Zhao, Q., T. Yin, J. Peng, Y. Zou, J. Yang, A. Shen and J. Hu (2013). "Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using a simple spectroscopy adjunct to morphology for embryo assessment in in vitro fertilization (IVF)." International journal of molecular sciences **14**(4): 6556-6570.

CAPÍTULO 2

Procedimentos para avaliar o meio de cultivo embrionário bovino por cromatografia líquida e espectrometria de massa

RESUMO

A avaliação morfológica é atualmente o método utilizado para a seleção de embriões bovinos produzidos *in vitro*, sendo pouco eficiente para identificar aqueles de melhor qualidade. Portanto, existe a necessidade de buscar outros métodos alternativos que sejam mais acurados e que realmente selecionem os embriões mais viáveis para serem transferidos. Um dos métodos promissores é o uso da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa devido a sua alta reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade. Entretanto, utilizando os protocolos descritos na literatura para esse tipo de análise não foi possível obter resultados confiáveis. Portanto, o objetivo desse estudo foi estabelecer uma metodologia para avaliar o meio de cultivo de embriões bovinos com essa técnica. A primeira condição para utilizar o meio como fonte de um possível marcador de seleção embrionária é ter o cultivo individual. Sendo assim, inicialmente foi avaliado o cultivo individual somente nas últimas 48 horas de cultivo e, com diferentes suplementos [soro fetal bovino (SFB - grupo controle), albumina sérica bovina (BSA) e BSA associada a insulina, transferrina e selênio (BSA+ITS)]. Como resultado o meio suplementado com BSA + ITS aumentou em 16% ($p < 0,05$) a taxa de embrião no dia 7 comparado ao meio com BSA, sendo a opção para os próximos cultivos. Então, as gotas do meio de cultivo individual contendo ou não embrião (controle) nas últimas 48 horas do cultivo foram coletadas. As gotas foram analisadas pela técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), porém não foi possível obter resultados cromatográficos que distinguisse os meios do cultivo com e sem embrião. Portanto, buscou-se quantificar a glutamina e a albumina presentes na eluição do cromatograma de ambos os meios, porém não foi possível quantificar a real concentração da glutamina e não foi observada diferença na concentração de albumina entre eles ($p > 0,05$). Como os resultados da cromatografia não distinguiram os meios, optou-se por realizar a técnica de espectrometria de massa com ionização em *eletrospray* (ESI-MS) sem a realização prévia da cromatografia. Parâmetros como massa/carga e intensidade de sinal foram utilizados para a análise estatística. Os resultados obtidos pela análise dos componentes principais (PCA)

e Dendograma, foram capazes de distinguir os meios com e sem embrião evidenciando a formação de *clusters* distintos. A partir desse resultado, a técnica ESI-MS foi identificada como a mais indicada para analisar o meio de cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Palavras-chave: blastocisto, cromatografia líquida, espectrometria de massa, *in vitro*, meio de cultivo.

ABSTRACT

Although morphological evaluation is currently the method used for selection of bovine embryos produced *in vitro*, this approach is very limited in identifying embryos with the highest quality. Therefore, there is a need for searching new methods that can be used to indicate with high accuracy blastocysts with the greatest potential to develop until their birth. One of the promising methods is the liquid chromatography coupled with mass spectrometry due to its high reproducibility, sensitivity and specificity. However, when we use the protocols described in the literature for this type of analysis, we have not obtained reliable results. Therefore, the objective of this study was to establish a methodology to evaluate culture medium of bovine embryos using liquid chromatography and mass spectrometry. The first condition to use the medium as a source of possible markers for embryonic selection was to establish the individual cultures. Then, individual culture was during the last 48 hours of culture was evaluated using different supplements [fetal bovine serum (FBS - control group), bovine serum albumin (BSA) and BSA associated with insulin, transferrin and selenium (BSA+ITS)]. As a result, the BSA + ITS medium increased by 16% ($p < 0.05$) embryo production at day 7 compared to the BSA alone, being the treatment chosen for the next experiments. Then, medium exposed or not (control medium) to embryos for the last 48 h of culture were collected and analyzed using the high-performance liquid chromatography (HPLC). However, chromatographic results were not able to distinguished between medium with and without embryo. Next, glutamine and albumin present in the chromatogram elution of the culture medium with and without embryo was quantified. However, it was not possible to evaluate the real concentration of glutamine and no differences ($p > 0.05$) were observed between medium samples regarding the albumin concentration. As the spectrometry results were not able to distinguish the media, it was performed the electrospray ionization mass spectrometry technique without previous chromatography. Since no differences in the media were detected by chromatography analysis, we chose to use electrospray ionization mass spectrometry approach (ESI-MS) without previous

chromatography analysis. Parameters such as mass/load and signal intensity were used for statistical analysis. Results obtained by Principal Component Analysis (PCA) and Dendrogram, clearly distinguished media with and without embryo showing formation of clusters. Based on this result, the ESI-MS method was indicated as the most adequate to be used for analysis of culture medium from bovine embryos produced *in vitro*.

Keywords: blastocyst, liquid chromatography, mass spectrometry, *in vitro*, culture medium.

1. INTRODUÇÃO

A busca por novas ferramentas não invasivas para avaliar a qualidade do embrião produzido *in vitro* com maior potencial de implantação e nascimento tem sido o foco de diversos estudos e em diferentes espécies (Gardner et al., 2001; Brison et al., 2004; Paul et al., 2005; Uyar e Seli, 2014; Krisher et al., 2015; Lee et al., 2015). As avaliações não invasivas visam complementar a atual técnica de seleção morfológica, que pouco informa sobre a qualidade embrionária. Atualmente, a melhor alternativa para identificar potenciais marcadores bioquímico de maneira não invasiva para embriões produzidos *in vitro* é a análise do meio de cultivo, visto que esse é descartado logo após o término do cultivo e, pode refletir a atividade metabólica dos embriões e, conseqüentemente sua qualidade.

Diferentes técnicas estão sendo utilizadas para avaliar o meio na tentativa de identificar moléculas que possam ser utilizadas como marcadores bioquímicos. Dentre as técnicas, estão a espectroscopia *nuclear magnetic resonance* (NMR), a *near infrared spectroscopy* (NIR) e a espectrometria de massa (MS).

A NMR apresenta algumas limitações, as quais podem ser atribuídas à necessidade de um grande volume de amostra, além do alto custo e da falta de sensibilidade em amostras com baixa quantidade de metabólitos (Perkel e Madan, 2017). Por outro lado, a NIR, já foi utilizada para avaliar o meio de cultivo embrionário em vários estudos, mas não é considerada eficaz para ser utilizada na rotina clínica. Isso porque seus resultados não são capazes de aumentar a taxa de gestação e nascimento quando comparado com a avaliação morfológica (Hardarson et al., 2011; Vergouw et al., 2012; Vergouw et al., 2014).

Já a espectrometria de massa (MS) é uma técnica com alta sensibilidade o que permite a avaliação individual da amostra sem a necessidade de formação de *pools*, sendo possível associar o perfil metabólico de cada embrião com o seu desenvolvimento pós-transferência (Muñoz et al., 2014; Krisher et al., 2015). A sensibilidade e especificidade da MS

ainda podem ser aumentadas quando utilizada em conjunto com a técnica de cromatografia líquida (LC) ou gasosa (GC). A vantagem da LC é a alta reprodutividade, enquanto a cromatografia gasosa, é altamente eficiente para detectar e quantificar metabólitos de baixo peso molecular capazes de atingir níveis de volatilização (Perkel et al., 2015). Também a MS com ionização tipo eletrospray (ESI-MS) já foi relatado com sucesso em meio de cultivo de embriões humanos (Cortezzi et al., 2013).

No entanto, o resultado da análise do meio de cultivo utilizando a MS pode ser afetado por vários fatores, dentre eles, a fonte proteica do meio. O soro fetal bovino (SFB), por exemplo, utilizado na maioria dos sistemas de cultivos *in vitro* de embriões bovinos pode ter um efeito prejudicial no resultado da MS. O fato é que os constituintes do SFB ionizam melhor que os componentes da amostra, comprometendo assim os resultados encontrados. Além disso, a variação na composição do SFB entre os lotes e a presença de componentes indefinidos desfavorecem o uso desta fonte proteica para o uso dessas novas abordagens de análise. Esse pode ser um fator limitante para o uso da MS, já que as maiores taxas de embriões *in vitro* são obtidas quando o SFB é utilizado como fonte proteica do meio de cultivo. Portanto, para viabilizar o uso do meio de cultivo na MS, na tentativa de identificar marcadores, é necessário substituir o SFB por outra fonte proteica e que não afete drasticamente a taxa de produção de embriões.

A alternativa para substituir o SFB do meio é a albumina sérica bovina (BSA), que já vem sendo utilizada para o cultivo de embriões bovinos e que apesar de reduzir as taxas de blastocisto possui resultados aceitáveis (Rizos et al., 2003; Gómez et al., 2008; Guimarães et al., 2016; Hamdi et al., 2018; Sena-Netto et al., 2020). Entretanto, o uso da albumina também possui limitações no sentido de afetar a avaliação pela MS por ter de alto peso molecular (66 KDa) e a função de *scavenger* de pequenas moléculas que desfavorecem a ionização e detecção dos demais componentes da amostra. Entretanto, essa limitação é solucionada ao realizar previamente protocolos de precipitação de proteínas utilizando solventes orgânicos como por exemplo o metanol.

Conforme já mencionado, o uso da MS associada a cromatografia líquida seria a alternativa mais indicada para avaliar o meio na tentativa de identificar algum marcador bioquímico para seleção de embriões bovinos. Entretanto, ao decorrer das análises, não foi possível reproduzir com eficácia as metodologias já descritas na literatura que também utilizaram a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa. Portanto, o objetivo deste estudo foi estabelecer, em nosso sistema, procedimentos para avaliar o meio de cultivo de embriões

bovinos com segurança e eficiência na tentativa de se identificar potenciais marcadores bioquímicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A menos que seja indicado, todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). O experimento foi realizado nos Laboratórios de Reprodução Animal e Espectrometria de Massas da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF.

2.1 Produção *in vitro* de embriões (PIV)

Para as PIV os ovários foram obtidos de abatedouros comerciais e transportados em solução salina 0,9 % a 35°C até o laboratório. Quatro réplicas foram realizadas totalizando 648 complexos *cumulus* ovócito (CCOs). Somente os CCOs com citoplasma homogêneo e no mínimo três camadas de células do *cumulus* foram usados. Grupos de 25 a 30 CCOs foram colocados em gotas de 150 µL de meio de maturação composto de TCM-199 com sais de Earl's (Gibco BRL, Burlington, Canadá) adicionado de 0,075 mg/mL de amicacina, 10% de SFB (Gibco®), 0,1mg/mL de L-glutamina, 1 µM de piruvato, 1 µM/mL de cisteamina e 0,01 UI/mL de FSH em estufa com atmosfera de 5% CO₂ em ar, 38,5°C por 24 horas.

Após o período de maturação, os CCOs foram transferidos para o meio de fecundação (FEC) composto de Tyrode's albumin lactate pyruvate [TALP] (Parrish et al., 1995) suplementado com 0,5 mM de penicilamina, 0,25 mM de hipotaurina, 25 µM de epinefrina e 10 µg/mL de heparina. O dia da inseminação foi considerado como dia 0 (D0) e utilizou-se sêmen de um mesmo touro da raça Nelore na concentração final utilizada foi de 1 x 10⁶ espermatozoides/mL.

Após a co-incubação os possíveis zigotos foram colocados em gotas de 150 µL de meio SOFaa (Holm et al., 1999) adicionado de 0,0293 mg/mL de L-glutamina, 0,35 mM de sódio tri-citrato, 2,8 mM de myo-inositol, 8 mg/mL de piruvato, 0,075 mg/mL de amicacina, solução de aminoácidos essenciais (BME 50x), solução de aminoácidos não essenciais (MEM

100x). A fonte proteica adicionada ao meio SOFaa foi 5% de soro fetal bovino (SFB) ou 0,4% de albumina sérica bovina (BSA) ou 0,4% BSA suplementado com 10 mg/mL insulina; 5,5 mg/mL transferrina e 5 µg/mL selênio (BSA+ITS) conforme o grupo, sendo 5% SFB o grupo controle. O cultivo foi realizado em atmosfera de 5% CO₂ em ar a 38,5° C.

O desenvolvimento embrionário foi avaliado no D2 (48 horas pós-inseminação) para clivagem e no D5 (120 horas pós-inseminação) para formação de mórula. Os embriões no estágio de mórula compacta no D5 foram transferidos para o cultivo individual, o qual foi realizado em uma nova placa com gotas de 20 µL do mesmo meio e nas mesmas condições de cultivo citadas anteriormente. Gotas de 20 µL sem embrião foram adicionadas na mesma placa e foram utilizadas como controle. Os embriões permaneceram no cultivo individual por 48hs até completar o D7 de desenvolvimento (168 horas pós-inseminação).

2.2 Coleta do meio de cultivo

No D7 de cultivo quando os embriões em estágio de Bx foram removidos do meio de cultivo individual, uma alíquota de 10 µL de cada gota e da gota controle (sem embrião) foi coletada e armazenada individualmente em microtubo de polipropileno em - 80°C até a realização das análises.

2.3 Cromatografia do meio de cultivo

Os meios de cultivo da gota controle e dos embriões Bx foram solubilizados em 50 µL de solvente A, consistindo de uma solução de 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA), e fracionados por Cromatografia Líquida de Ultra Resolução de Fase Reversa (RP-UPLC) (Shimadzu Corporation, Japão) utilizando coluna analítica (Shim-pack XR-ODS 30L x 2.0 P/N 228-41605-91, shimadzu). Os componentes foram eluídos em gradiente linear segmentado de solvente B (acetonitrila/TFA 0,1%): 5 % (0 à 5 min); 5 a 75 % (5 à 25 min); 75 a 95 % (25 à 30 min) e 95 % (30 à 35 min), com fluxo de 0,4 mL/min. Os componentes foram monitorados nos comprimentos de onda 216 e 280 nm. Os dados foram processados pelo software *LC solution* (Shimadzu Corporation, Japão).

Para avaliar e quantificar a glutamina presente no meio de cultivo, utilizou a mesma metodologia descrita acima. Cinco réplicas cromatográficas foram realizadas de cada amostra. As amostras analisadas foram separadas em três grupos: meio de cultivo sem a adição da glutamina, meio de cultivo com adição da glutamina e a glutamina dissolvida em água deionizada (controle). Para essas avaliações o meio de cultivo não continha BSA + ITS.

Para as análises cromatográficas da albumina no meio de cultivo Bx (n = 12) e controle (n = 8), as amostras foram solubilizadas em 160 μ L de solvente A com 0,1% TFA, fracionado por RP-UPLC (Shimadzu Corporation, Japão), utilizando coluna analítica μ RPC C2/C18 ST 4.6/100 e eluído em gradiente linear segmentado de solvente B: 5% (0 à 3 min); 5 a 80% (3 à 13 min); 80% (13 à 16 min) e 5% (16 à 20 min), com fluxo de 0,6 mL/min. Os componentes foram monitorados nos comprimentos de onda 216 e 280 nm. Os dados foram processados pelo software LC solution (Shimadzu Corporation, Japão).

2.4 Extração dos metabólitos

Em um microtubo de 1,5 mL, foram adicionados 10 μ L do meio de cultivo e 50 μ L de metanol (1:5) a - 20°C, seguido de uma agitação em vórtex por 20 segundos. Posteriormente, as amostras permaneceram incubadas por 12 horas em - 20°C. Após esse período as amostras foram então centrifugadas a 14.000 rpm por 30 min a 4°C. O sobrenadante (contendo os aminoácidos) foi coletado e armazenado em novo microtubo de 1,5 mL e o *pellet* (contendo albumina) permaneceu no mesmo microtubo. Ambos foram secos até a evaporação do solvente e armazenados em - 20°C para posterior análise.

2.5 Espectrometria de massa

As seis frações da glutamina eluídas pela técnica de cromatografia líquida foram solubilizadas em 200 μ L de acetonitrila e H₂O deionizada na proporção 1:1 (v:v), contendo 0,1% de ácido fórmico (AF). As amostras foram analisadas por espectrômetro MicroOTOF-Q II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), operando em modo positivo e a faixa de massa analisada 50 – 1500 *m/z*.

Os aminoácidos contidos nos meios de cultivo sem BSA foram analisados. Primeiro analisou-se o meio controle (n = 3) e Bx (n = 3). E em um segundo momento outras amostras de meios controle (n = 9) e Bx (n = 15) foram analisadas. Em todas as análises as amostras foram solubilizadas em 100 μ L de acetonitrila/H₂O (70:30) contendo 0,1% AF. As análises foram realizadas com o uso de espectrômetro Impact II ESI-Q/TOF (Bruker Daltonics, Bremen - Germany), operando em modo positivo com ionização tipo *electrospray* e a faixa de massa analisada foi de 50 - 1500 *m/z*.

2.6 Análise estatística

Foi utilizado Qui-quadrado para dados referentes à taxa de produção de embriões. O Teste t para analisar a concentração da albumina. Os dados gerados pela análise espectrométrica como massa/carga (m/z) e intensidade de sinal foram utilizados para avaliações da análise dos componentes principais (PCA) e Dendograma (*softwares* DataAnalysis Bruker®), com o objetivo de visualizar clusters. Diferenças foram consideradas significativas quando ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 Produção *in vitro* de embriões PIV

Os resultados mostraram que o cultivo individual de D5 ao D7 no meio suplementado com SFB produziu uma maior porcentagem de mórulas em D5 e de blastocistos em D7, do que nos grupos em que o SFB foi removido do cultivo (Tabela 1). Entretanto, um efeito benéfico do ITS foi observado na taxa de blastocisto quando esse foi associado a BSA.

Tabela 1: Produção *in vitro* de embriões bovinos cultivados em grupo até o dia 5 e individualmente do dia 5 ao dia 7 em meio de cultivo suplementado com soro fetal bovino (SFB), com 0,4% de albumina sérica bovina (BSA) ou com 0,4% BSA associado à 10 mg/mL insulina; 5,5 mg/mL transferrina e 5 µg/mL selênio (BSA+ITS).

Grupo	Ovócitos viáveis	Clivados n (%)	Mórulas em D5 n (%)	D7		
				total de embriões	blastocisto / Ovócitos (%)	blastocisto / Mórulas (%)
SFB	258	209 (81) ^a	103 (40) ^a	67	26 ^a	65 ^a
BSA	321	234 (73) ^b	95 (30) ^b	31	10 ^b	33 ^b
BSA+ITS	337	279 (83) ^a	108 (32) ^b	53	16 ^c	49 ^c

^{a, b, c} dados com diferentes sobrescritos na mesma coluna diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$) n: número.

De acordo com esses resultados, o meio suplementado com BSA+ITS foi selecionado para ser utilizado nos experimento em que foram realizadas as avaliações por cromatografia líquida e espectrometria de massa. Após a seleção do meio, embriões foram produzidos e o meio coletado para as análises. Os resultados da produção de embriões para coleta do meios estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Produção *in vitro* de embriões bovinos cultivados em grupo até o dia 5 (D5) e individualmente entre os dias 5 e 7 (D7) do desenvolvimento embrionário em meio de cultivo suplementado com 0,4% de albumina sérica bovina e 10 mg/mL insulina; 5,5 mg/mL transferrina e 5 µg/mL selênio (BSA+ITS).

Réplica	CCO Viáveis	Nº Clivados (%)	Nº Mc em D5 (%)	Nº embriões (D5-D7)	(%) embriões / CCOs	(%) embriões / Mc
1	144	135 (93,7)	36 (25,0)	22	15,3	61,1
2	171	146 (85,4)	32 (18,7)	24	14,0	75,0
3	202	173 (85,6)	34 (16,8)	25	12,4	73,5
4	131	108 (82,4)	22 (16,8)	18	13,7	81,8
Total	648	562 (86,7)	124 (19,1)	89	13,7	71,8

CCO: complexo *cumulus* ovócito; Nº: número; Mc: mórula compacta

3.2 Análises cromatográficas

Foi observado em todas as amostras somente duas frações sendo eluídas em 30% e 46% do gradiente, que corresponderam ao vermelho fenol e albumina respectivamente. Na fase hidrofílica foram observadas cinco frações, nas quais acredita-se conter todos os outros componentes do meio, principalmente os aminoácidos que são adicionados ao meio de cultivo SOFaa (Figura 1).

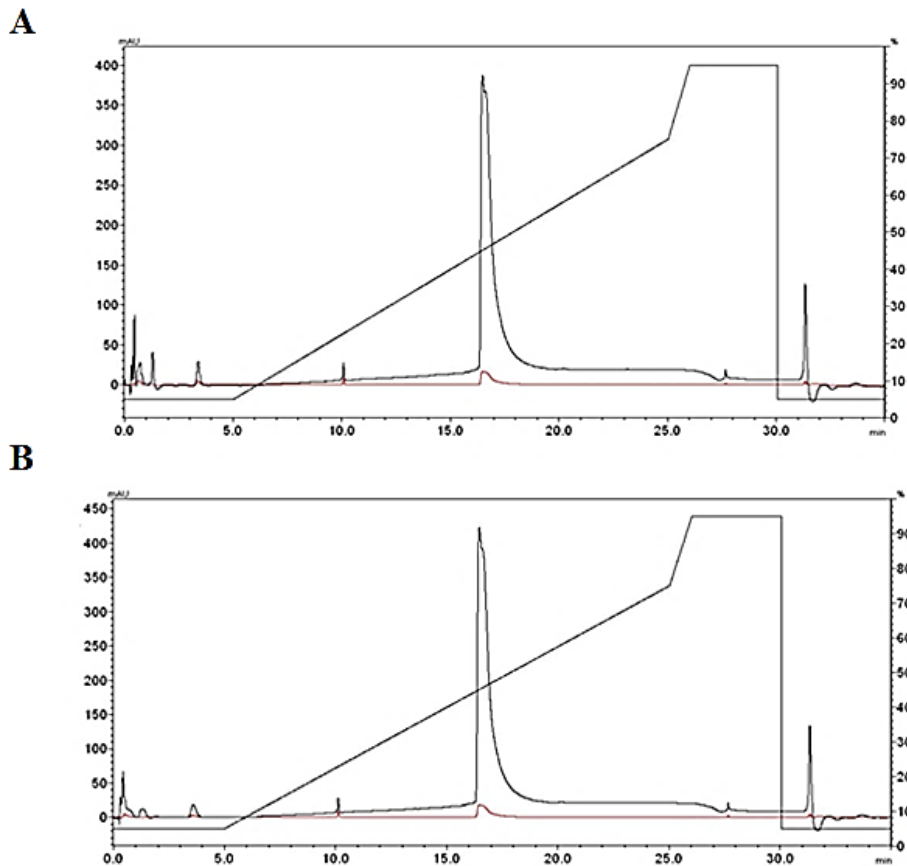


Figura 1. Gráfico do cromatograma do meio de cultivo de embrião bovino cultivado em meio de cultivo suplementado de 0,4% de albumina sérica bovina e 10 mg/mL insulina; 5,5 mg/mL transferrina e 5 μ g/mL selênio (BSA+ITS) entre D5 e D7 do desenvolvimento embrionário. O eixo x indica o tempo de retenção em que os compostos foram eluídos. Até os 5 min região hidrofílica, dos 5 aos 25 min região de eluição. (A) cromatograma do meio controle (sem embrião); (B) cromatograma do meio de cultivo com embrião (Bx).

3.2.1 Análises cromatográficas: Glutamina

As amostras do meio de cultivo sem a fonte proteica (BSA+ITS) que continham ou não glutamina resultaram na obtenção de seis frações eluídas na fase hidrofílica exceto a fração do vermelho fenol (Figura 2A e 2B). No grupo controle (glutamina + água deionizada), somente uma fração foi eluída no tempo de retenção de 0,41 segundos, mostrando que a eluição da glutamina ocorreu na fase hidrofílica e que ela não foi eluída junto com a fração da BSA (Figura 2C).

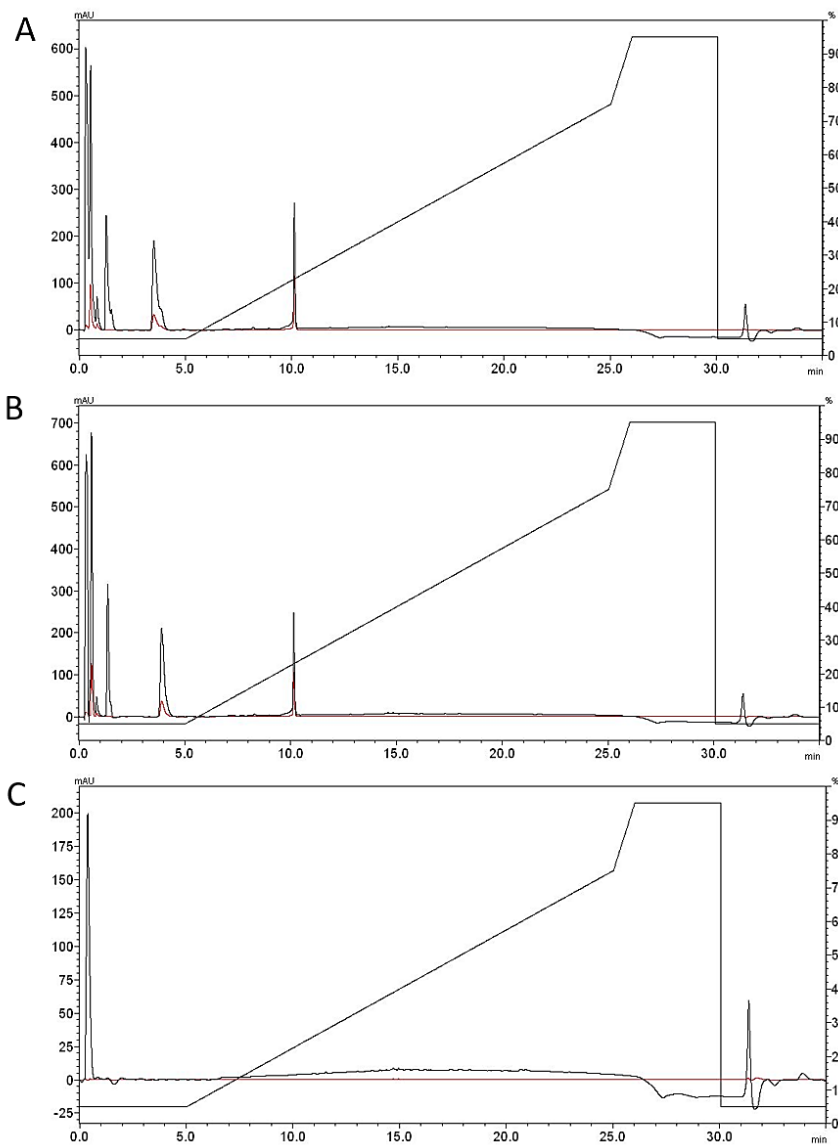


Figura 2. Gráfico dos cromatogramas do gradiente de eluição do meio de cultivo sem 0,4% de albumina sérica bovina e 10 mg/mL insulina; 5,5 mg/mL transferrina e 5 µg/mL selênio (BSA+ITS). (A) cromatograma do meio de cultivo sem adição de glutamina. (B) cromatograma do meio de cultivo com adição de glutamina. (C) cromatograma da amostra controle (água deionizada + glutamina). Eixo X indica o tempo de retenção de cada composto eluído.

3.2.2 Análises cromatográficas: Albumina

A fração da albumina foi eluída aos 52% do gradiente, em ambos os grupos (meio controle e meio Bx) (Figura 3). A área sob a curva de cada fração eluída foi calculada e as médias dos grupos foram comparadas. Nenhuma diferença direta no cromatograma foi observada e nos valores da integração de área dos picos (Figura 4).

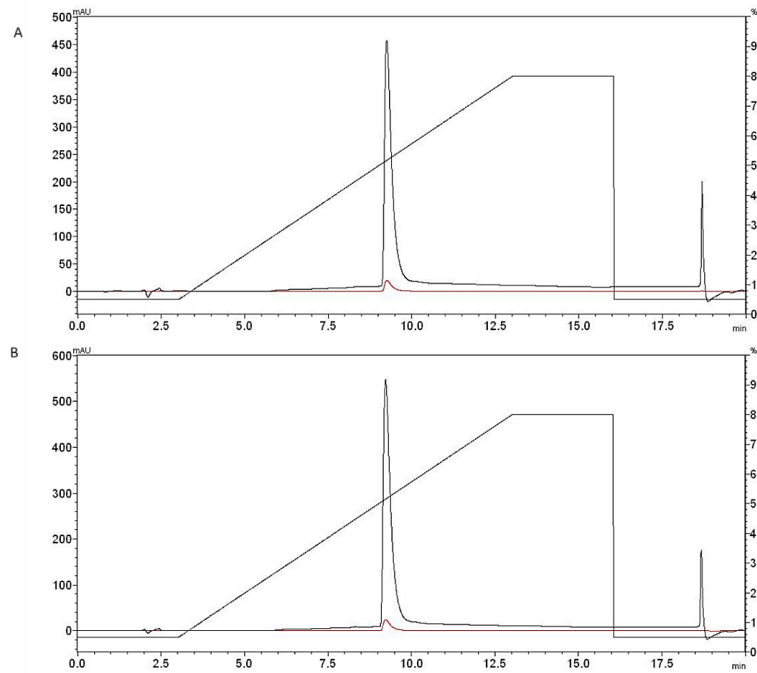


Figura 3. Gráfico dos cromatogramas do gradiente de eluição da fração proteica do meio de cultivo de embriões bovino. (A) meio de cultivo com embrião (Bx), (B) Meio de cultivo controle (sem embrião).

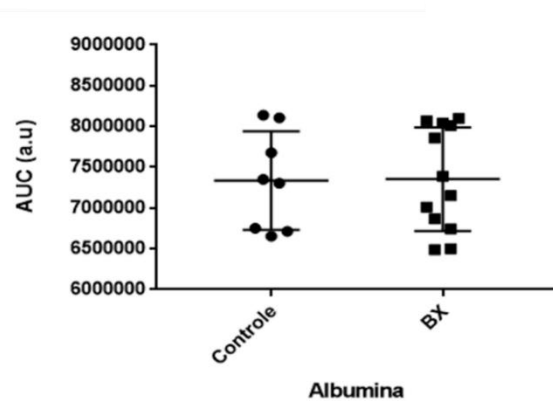


Figura 4. Concentração da albumina em unidades arbitrárias do meio de cultivo controle (sem embrião) e com embrião (Bx – blastocisto expandido). Dados analisados por Test t ($p = 0,95$).

3.3 Espectrometria de massa

3.3.1 Análise dos aminoácidos

Foi observada a presença da massa da glutamina nas seis frações do meio com glutamina da fase hidrofílica da cromatografia líquida, evidenciada pela presença do íon $[M + H]^+ = 147$. Não foi possível quantificar os aminoácidos do meio de cultivo por RP-UPLC-MS devido a sobreposição de outros íons aos aminoácidos.

3.3.2 Análise ESI-MS

Mesmo com a obtenção dos espectros que continham inúmeros íons (m/z), nenhuma diferença relevante na faixa de massa 50 - 1500 m/z foi observada entre os meios (Figura 5). Mesmo assim, foi possível distinguir o meio controle do meio com embrião (Bx) ao realizar a análise dos componentes principais (PCA) e Dendograma (Figura 6).

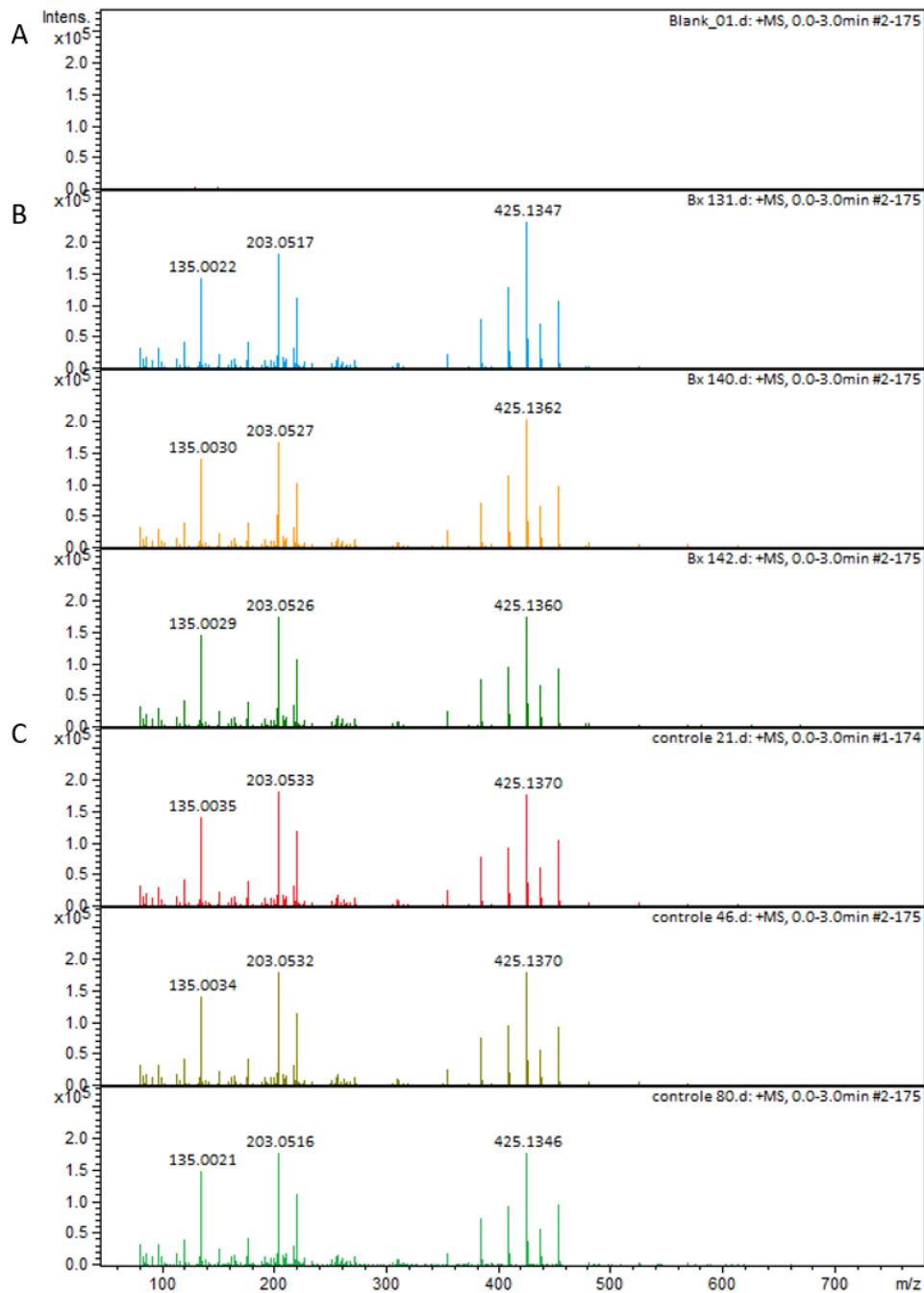


Figura 5. Espectros de massa obtidos por Impact II ESI-Q/TOF das amostras de meios de cultivo de embriões bovino obtidos em modo íon positivo na faixa analisada 50 – 1500 m/z . Eixo x: m/z : massa carga; eixo y: intensidade de sinal. Espectros representativos de todas as amostras controle (sem embrião) e Blastocisto expandido (Bx) analisadas. (A) Branco (B) três amostras do sobrenadante dos meios de cultivo Bx e (C) três amostras de sobrenadantes do meio de cultivo controle.

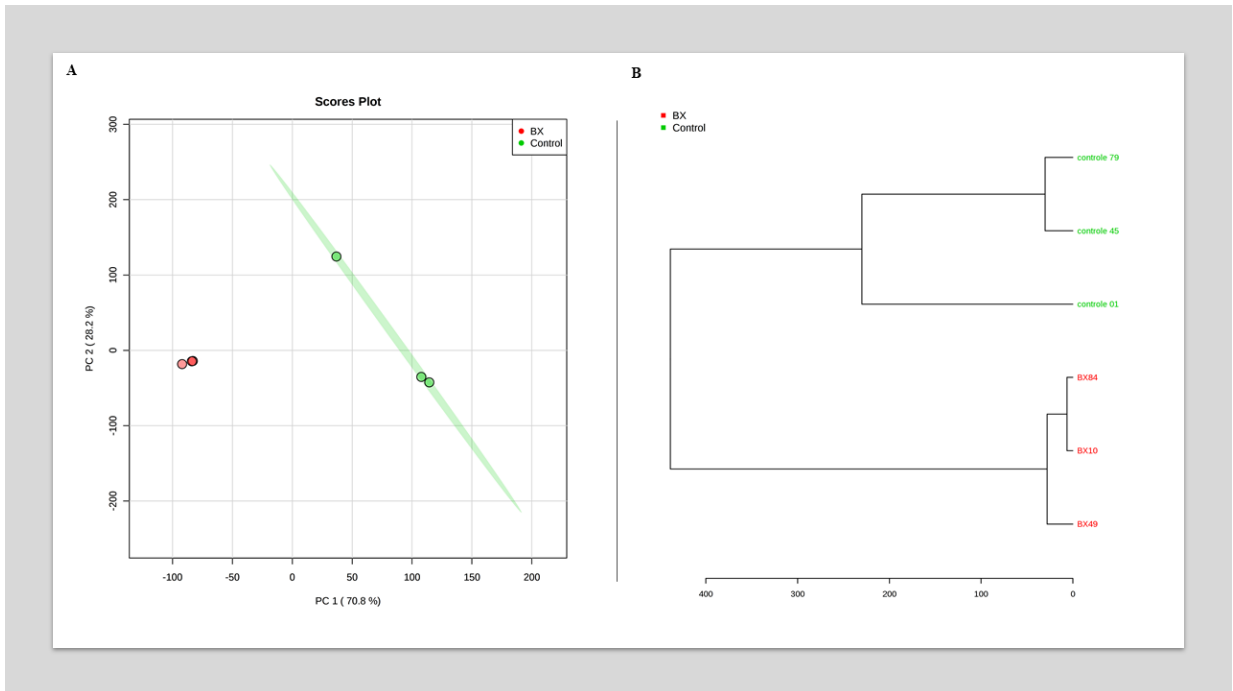


Figura 6. Análise do meio de cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* do grupo controle (verde) e blastocisto expandido (Bx- vermelho) em meio de cultivo suplementado de 0,4% de albumina sérica bovina e 10 mg/mL insulina; 5,5 mg/mL transferrina e 5 µg/mL selênio (BSA+ITS). (A) Análise das componentes principais (PCA) *score plot* PCA 1 x PCA 2. (B) Representação gráfica das análises por Dendograma.

4. DISCUSSÃO

A PIV é uma técnica bem estabelecida, porém a maioria dos embriões transferidos não são capazes de estabelecer e manter uma gestação. Desta forma, uma seleção mais acurada e que indique embriões mais viáveis para serem transferidos é fundamental para aumentar a eficiência dessa técnica. Uma das alternativas é identificar marcadores bioquímicos no meio em que os embriões são cultivados, visto que esse meio pode indicar o *status* metabólico dos embriões e, conseqüentemente a sua qualidade. Entretanto, para que isso seja possível, a primeira exigência é realizar o cultivo individual, para que se possa acompanhar o desempenho posterior de cada embrião. A segunda exigência é ter um procedimento adequado no que se refere as técnicas utilizadas para que os resultados obtidos sejam confiáveis e fidedignos.

Portanto, o primeiro passo neste estudo foi estabelecer um sistema de cultivo *in vitro* que permitisse coletar o meio em que os embriões permaneceram por algum período, mas individualmente. Além disso, esse sistema não poderia ter a presença de SFB como fonte proteica ao meio SOFaa, já que esse interfere na análise dos metabólitos do meio de cultivo. Com isso, foi então testado o uso da BSA associado a insulina, transferrina e selênio (ITS) na tentativa de amenizar o efeito da remoção do SFB. Os resultados mostraram que a remoção do SFB reduz a produção de embriões em D7. Esse resultado, era esperado considerando a vasta literatura que mostra os efeitos benéficos do SFB no desenvolvimento embrionário dentre eles a proliferação celular. Porém, quando a ITS foi adicionada ao meio SOFaa+BSA a taxa de blastocistos no D7 aumentou em relação ao meio SOFaa+BSA. Esses resultados estão de acordo com os relatados por (Guimarães et al., 2016; Rodrigues et al., 2020)) e deve-se, provavelmente, ao conjunto de funções de cada composto do ITS. A insulina induz o *uptake* de glicose e aminoácidos o que favorece a proliferação celular, a transferrina tem a função de transportadora de ferro, diminuindo níveis de toxicidade do meio e o selênio com a ação antioxidante. Com a obtenção deste resultado o uso da BSA associada ao ITS foi estabelecido para os demais experimentos.

Com relação as análises do meio de cultivo contendo ou não embrião, a ideia inicial foi seguir as metodologias já descritas na literatura, porém, ao analisar esses meios por cromatografia líquida de fase reversa, somente duas frações foram obtidas no gradiente de eluição, sendo elas identificadas como vermelho fenol e albumina. Esse resultado foi inesperado, pois devido à complexidade da amostra era esperado encontrar diversos compostos sendo eluídos. Entretanto, outras frações eluídas foram observadas na fase hidrofílica do cromatograma e, talvez a diferença entre os meios poderia estar nesta região.

Antes de analisar a região hidrofílica a fração correspondente a albumina foi quantificada, porém não houve diferença entre as concentrações das amostras controle e Bx. A diferença entre essas amostras era esperada, devido ao consumo ou degradação da albumina que deveria ser diferente entre o meio que continha embrião e o que não continha. Caso fosse encontrado alguma diferença, a própria albumina poderia servir como um marcador de qualidade embrionária. Seguindo as análises, a fração hidrofílica do cromatograma, foi direcionada à quantificação dos aminoácidos, visto que, eles são eluídos nesta região. Dentre os aminoácidos, optou-se por quantificar a glutamina, porém em todas as frações eluídas a glutamina estava presente, inviabilizando sua real quantificação.

Então os demais aminoácidos foram analisados pela técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) que utiliza a absorvância em UV acoplada a um espectrômetro de massa. Esse serve, basicamente, como um segundo detector que permite saber os valores de massa / carga das moléculas eluídas em cada pico da cromatografia. Para realizar a quantificação, é preciso obter picos individuais para os respectivos aminoácidos, o que não foi possível, devido ao fato de existirem outras moléculas em maior abundância iônica sendo eluídas juntas aos picos dos aminoácidos. Isso, provavelmente foi devido à alta complexidade do meio de cultivo analisado, mas ao mesmo tempo divergiu de outros trabalhos que avaliaram o *turnover* dos aminoácidos presentes no meio de cultivo (Houghton et al., 2002; Brison et al., 2004; Picton et al., 2010).

Como não foi possível quantificar os aminoácidos, foi realizado uma aproximação não-quantitativa, não por variação de quantidade, mas por detecção ou não detecção. Para essa nova abordagem de análise, a cromatografia líquida foi excluída da metodologia, visto que, o processo levaria mais tempo e não usaria o detector UV do cromatógrafo para quantificar. Por isso, optou-se pela injeção direta do meio de cultivo em espectrômetro de massa Impact II ESI-Q/TOF[®] com o objetivo obter um *screening* global entre os espectros do meio controle e do meio em que houve desenvolvimento do embrião até o estágio de Bx, em busca de diferenças entre os perfis.

Primeiro buscou a padronização do volume da amostra afim de excluir a interferência deste fator no resultado de detecção dos íons. Com isso, seis amostras do meio de cultivo nos volumes de 10, 7, 5, 3, 2 e 1 μL foram submetidos ao protocolo de precipitação da albumina seguido da evaporação do solvente. No momento da infusão direta todas as amostras foram solubilizadas em 100 μL de solução acetonitrila: H_2O (70:30) com 0,1% de ácido fórmico. Como não houve diferença entre os volumes utilizou 1 μL do meio, para as demais análises.

Após a obtenção dos espectros do meio de cultivo controle e Bx, não foi possível identificar íons de potenciais biomarcadores que estivessem presentes em pelo menos um grupo. Este resultado pode ser atribuído a complexidade da amostra analisada somado ao fato de que somente compostos que ionizam e conseguem chegar ao detector são identificados. Mesmo assim, os parâmetros obtidos pelos espectros como massa / carga e intensidade de sinal foram suficientes para diferenciar os grupos controle do Bx.

Em suma, com os resultados obtidos neste estudo pode-se inferir que o uso do soro fetal bovino (SFB) como fonte proteica no meio de cultivo é inviável para a realização de análises em espectrometria de massa. Também, o uso da insulina, transferrina e selênio (ITS) aumenta a taxa de blastocisto em D7 quando adicionado ao meio de cultivo suplementado com albumina sérica bovina (BSA), sendo uma alternativa para aumentar a taxa de embriões na ausência do SFB. Já em relação as ferramentas de análises, o uso da espectrometria de massa com ionização em eletrospray (ESI-MS) é uma técnica rápida, não invasiva ao embrião e apta para diferenciar os meios de cultivos. Não sendo necessário estar acoplada a cromatografia líquida, o que reduz o tempo de cada análise e reduz o custo operacional.

5. CONCLUSÃO

A técnica de espectrometria de massa com ionização em *eletrospray* (ESI-MS) pode ser utilizada sem estar acoplada a cromatografia líquida para diferenciar os meios de cultivo de embriões bovinos, desde que o SFB não esteja presente.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Brison, D. R., F. D. Houghton, D. Falconer, S. A. Roberts, J. Hawkhead, P. G. Humpherson, B. A. Lieberman and H. J. Leese (2004). "Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover." Human Reproduction **19**(10): 2319-2324.
- Cortezzi, S. S., E. C. Cabral, M. G. Trevisan, C. R. Ferreira, A. S. Setti, D. P. d. A. F. Braga, R. d. C. S. Figueira, A. Iaconelli, M. N. Eberlin and E. Borges (2013). "Prediction of embryo implantation potential by mass spectrometry fingerprinting of the culture medium." **145**(5): 453.
- Gardner, D. K., M. Lane, J. Stevens and W. B. Schoolcraft (2001). "Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential." Fertility and Sterility **76**(6): 1175-1180.
- Gómez, E., A. Rodríguez, M. Muñoz, J. N. Caamaño, C. O. Hidalgo, E. Morán, N. Facal and C. Díez (2008). "Serum free embryo culture medium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification." Theriogenology **69**(8): 1013-1021.
- Guimarães, A. L. S., S. A. Pereira, M. N. Diógenes and M. A. N. Dode (2016). "Effect of insulin–transferrin–selenium (ITS) and l-ascorbic acid (AA) during *in vitro* maturation on *in vitro* bovine embryo development." Zygote **24**(6): 890-899.
- Hamdi, M., R. Lopera-Vasquez, V. Maillo, M. J. Sanchez-Calabuig, C. Núñez, A. Gutierrez-Adan and D. Rizos (2018). "Bovine oviductal and uterine fluid support *in vitro* embryo development." Reproduction, Fertility and Development **30**(7): 935-945.
- Hardarson, T., A. Ahlström, L. Rogberg, L. Botros, T. Hillensjö, G. Westlander, D. Sakkas and M. Wikland (2011). "Non-invasive metabolomic profiling of Day 2 and 5 embryo culture medium: a prospective randomized trial." Human Reproduction **27**(1): 89-96.
- Holm, P., P. J. Booth, M. H. Schmidt, T. Greve and H. Callesen (1999). "High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using sofaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins." Theriogenology **52**(4): 683-700.
- Houghton, F. D., J. A. Hawkhead, P. G. Humpherson, J. E. Hogg, A. H. Balen, A. J. Rutherford and H. J. Leese (2002). "Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity." Human Reproduction **17**(4): 999-1005.

Karja, N. W. K., T. Otoi, M. Murakami, M. Yuge, M. Fahrudin and T. Suzuki (2002). "Effect of protein supplementation on development to the hatching and hatched blastocyst stages of cat IVF embryos." Reproduction, Fertility and Development **14**(5): 291-296.

Krisher, R. L., A. L. Heuberger, M. Paczkowski, J. Stevens, C. Pospisil, R. S. Prather, R. G. Sturmey, J. R. Herrick and W. B. Schoolcraft (2015). "Applying metabolomic analyses to the practice of embryology: physiology, development and assisted reproductive technology." Reproduction, Fertility and Development **27**(4): 602-620.

Krisher, R. L., W. B. Schoolcraft and M. G. Katz-Jaffe (2015). "Omics as a window to view embryo viability." Fertility and Sterility **103**(2): 333-341.

Lee, Y. S. L., G. A. Thouas and D. K. Gardner (2015). "Developmental kinetics of cleavage stage mouse embryos are related to their subsequent carbohydrate and amino acid utilization at the blastocyst stage." Human Reproduction **30**(3): 543-552.

Muñoz, M., A. Uyar, E. Correia, C. Díez, A. Fernandez-Gonzalez, J. N. Caamaño, D. Martínez-Bello, B. Trigal, P. Humblot, C. Ponsart, C. Guyader-Joly, S. Carrocera, D. Martin, B. Marquant Le Guienne, E. Seli and E. Gomez (2014). "Prediction of pregnancy viability in bovine *in vitro*-produced embryos and recipient plasma with Fourier transform infrared spectroscopy." Journal of Dairy Science **97**(9): 5497-5507.

Parrish, J. J., A. Krogenaes and J. L. Susko-Parrish (1995). "Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development." Theriogenology **44**(6): 859-869.

Paul, J. B., G. H. Peter, J. W. Terry and J. L. Lesse (2005). "Amino acid depletion and appearance during porcine preimplantation embryo development *in vitro*." Reproduction **130**(5): 655-668.

Perkel, K. J. and P. Madan (2017). "Spent culture medium analysis from individually cultured bovine embryos demonstrates metabolomic differences." Zygote **25**(6): 662-674.

Perkel, K. J., A. Tscherner, C. Merrill, J. Lamarre and P. Madan (2015). "The ART of selecting the best embryo: A review of early embryonic mortality and bovine embryo viability assessment methods." Molecular Reproduction and Development **82**(11): 822-838.

Picton, H. M., K. Elder, F. D. Houghton, J. A. Hawkhead, A. J. Rutherford, J. E. Hogg, H. J. Leese and S. E. Harris (2010). "Association between amino acid turnover and chromosome aneuploidy during human preimplantation embryo development *in vitro*." Molecular Human Reproduction **16**(8): 557-569.

Rizos, D., A. Gutiérrez-Adán, S. Pérez-Garnelo, J. de la Fuente, M. P. Boland and P. Lonergan (2003). "Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression1." Biology of Reproduction **68**(1): 236-243.

Rodrigues, S. A. D., T. P. Pontelo, N. R. Kussano, T. S. Kawamoto, L. O. Leme, F. M. C. Caixeta, L. F. M. Pfeifer, M. M. Franco and M. A. N. Dode (2020). "Effects of Prostaglandins E2 and F2 α on the *in vitro* maturation of bovine oocytes." Domestic Animal Endocrinology **72**: 106447.

Sena-Netto, S. B., J. F. W. Sprícigo, L. O. Leme, A. L. S. Guimarães, F. M. C. Caixeta, M. A. N. Dode and I. Pivato (2020). "The Replacement of Fetal Bovine Serum with Bovine Serum Albumin During Oocyte Maturation and Embryo Culture Does Not Improve Blastocyst Quality After Slow Freezing Cryopreservation." Biopreservation and Biobanking.

Uyar, A. and E. Seli (2014). "Metabolomic assessment of embryo viability." Seminars in reproductive medicine **32**(2): 141-152.

Vergouw, C. G., M. W. Heymans, T. Hardarson, I. A. Sfontouris, K. A. Economou, A. Ahlström, L. Rogberg, T. G. Lainas, D. Sakkas, D. C. Kieslinger, E. H. Kosteljik, P. G. A. Hompes, R. Schats and C. B. Lambalk (2014). "No evidence that embryo selection by near-infrared spectroscopy in addition to morphology is able to improve live birth rates: results from an individual patient data meta-analysis." Human Reproduction **29**(3): 455-461.

Vergouw, C. G., D. C. Kieslinger, E. H. Kosteljik, L. L. Botros, R. Schats, P. G. Hompes, D. Sakkas and C. B. Lambalk (2012). "Day 3 embryo selection by metabolomic profiling of culture medium with near-infrared spectroscopy as an adjunct to morphology: a randomized controlled trial." Human Reproduction **27**(8): 2304-2311.

Yoshioka, K., A. M. Othman, T. Taniguchi, H. Yamanaka and K. Sekikawa (1997). "Differential patterns of blastulation in bovine morulae cultured in synthetic oviduct fluid medium containing FCS or BSA." Theriogenology **48**(6): 997-1006.

CAPÍTULO 3

Marcadores bioquímicos para prenhez no meio de cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*

RESUMO

Embora a produção *in vitro* (PIV) de embrião esteja bem estabelecida e seja utilizada rotineiramente tanto em humanos quanto em animais de produção, as taxas de prenhez e nascimento após a transferência ainda permanecem baixas. Isso se deve principalmente a qualidade inferior dos embriões PIV associada a ineficiente seleção daqueles a serem transferidos. Assim, a busca por marcadores de viabilidade embrionária continua sendo um desafio nessa área. O objetivo deste estudo foi identificar biomarcadores no meio de cultivo para identificar embriões com capacidade de estabelecer prenhez. Para isso, os embriões produzidos *in vitro* no dia cinco do desenvolvimento embrionário foram transferidos para gotas individuais, onde permaneceram as últimas 48 horas de cultivo. No final do cultivo, o meio foi coletado e armazenado individualmente, e os embriões (n = 85) foram transferidos para receptoras sincronizadas. Após o diagnóstico de gestação, os meios foram separados em meio do cultivo dos embriões que geraram (n = 31) ou não prenhez (n = 54). Os perfis metabólicos dos meios foram analisados por espectrometria de massa com ionização tipo *eletrospray* (ESI-MS) e compostos específicos como piruvato, lactato e glutamato foram quantificados por fluorimetria. O perfil espectrométrico mostrou uma maior intensidade de sinal nos meios de cultivo de embriões que geraram prenhez comparado ao grupo não prenhe e aos que perderam a prenhez. Os íons 156,13 *m/z*; 444,33 *m/z* e 305,97 *m/z* podem ser considerados biomarcadores comparando o grupo prenhe com o não prenhe. Na quantificação fluorimétrica foi observado uma maior concentração de piruvato (p = 0,0174) e menor de lactato (p = 0,042) no meio de cultivo de blastocistos expandidos que geraram prenhez comparado ao não prenhe. A concentração de glutamato no meio de cultivo de blastocistos iniciais foi maior no grupo prenhe do que no não prenhe (p = 0,0299). A análise ROC mostrou que o piruvato no meio de cultivo de blastocistos expandidos pode prever a prenhez com 90,9% de sensibilidade e 75% de especificidade. Em conclusão, foram identificados biomarcadores no meio de cultivo que permitem selecionar os embriões mais viáveis utilizando a técnica de ESI-MS e fluorimetria.

Palavras-chave: bovinos, *eletrospray*, fluorimetria, implantação, perfil metabólico.

ABSTRACT

Although *in vitro* embryo production (IVP) is available and is routinely used both in human and in farm animals, pregnancy and birth rates after transferred are still low. The main factor responsible for that is the low quality of the IVP embryos associated with inefficient selection of those to be transfer. Thus, searching for markers of embryo viability continues to be a challenge in this field. The aim of the present study was to identify biomarkers in culture media to predict embryo ability to establish a pregnancy. To do that, IVP embryos on D5 were transferred to individual culture drops, where they remained for the last 48 hours of culture. At the end of the culture, medium was collected and stored individually, and the embryos were transferred to synchronized recipients. After pregnancy diagnosis the medium was separated in culture media from embryos that did or not generated pregnancy. Media were analyzed for metabolic profile for metabolic profile by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and for concentration of pyruvate, lactate and glutamate by fluorimetry. The spectrometric profile showed that media from embryos that generated pregnancy showed higher signal intensity compared to non-pregnant. The analysis PLS-DA identified that ions 156.13 m/z , 444.33 m/z , 305.97 m/z can be used as biomarkers. Media from of expanded blastocyst that generated pregnancy presented a higher concentration of pyruvate ($p = 0.0174$) and a lower of lactate ($p = 0.042$) than those from the non-pregnant group. The concentration glutamate was higher in the pregnant group than non-pregnant in culture media of initial blastocysts ($p = 0.0299$). ROC analysis revealed that pyruvate in culture media of expanded blastocysts may predict pregnancy with 90.9% of sensitivity and 75% of specificity. In conclusion, we identified markers in culture media that allow the assessment of the most viable embryos to transfer. These findings offer great potential for development of non-invasive methods to select IVP bovine embryos with greater ability to established and maintain pregnancy.

Keywords: cattle, electrospray, fluorimetry, implantation, metabolic profile

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) bovinos é uma biotécnica bem estabelecida e utilizada rotineiramente para acelerar o ganho genético dos rebanhos. Entretanto, sua eficiência ainda é considerada baixa, pois apresenta taxa de prenhez aos 30 dias em média de 40% e de nascimento apenas 27% (Ealy et al., 2019). Esses baixos índices resultam, principalmente, da menor qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro* quando comparados aos *in vivo*, associado a incapacidade de selecionar aqueles embriões com maior potencial de implantação. Esse cenário é um fator limitante para o uso da biotécnica, pois exige a manutenção de muitas receptoras não prenhes no rebanho, aumentando o custo da produção de embriões.

Rotineiramente a seleção dos embriões é realizada de acordo com critérios morfológicos que, apesar de constituir uma avaliação não invasiva e de baixo custo, não é capaz de selecionar somente os embriões com maior potencial de estabelecer e manter uma gestação. Dessa forma, desenvolver métodos mais precisos utilizando biomarcadores capazes de avaliar a qualidade do embrião é fundamental para que se possa selecionar somente os melhores e, conseqüentemente, reduzir as perdas embrionárias, aumentando o sucesso da PIV.

Estudos sugerem que o perfil metabólico do embrião avaliado no meio em que esse é cultivado pode indicar seu *status* fisiológico de maneira não invasiva. A maioria das pesquisas nesta área avaliam compostos específicos como a glicose, piruvato, lactato, homocisteína, aminoácidos e consumo de O₂ no meio de cultivo (Gardner et al., 2001; Sakkas e Gardner, 2005; Gardner et al., 2011; Henry, 2012; Sugimura et al., 2012; Boyama et al., 2016). Entretanto, o uso das técnicas de cromatografia e espectrometria de massa que permitem identificar uma grande variedade de moléculas (proteínas, açúcares, lipídeos) presentes no meio de cultivo (Kirkegaard et al., 2014; Krisher et al., 2015; Krisher et al., 2015), tornou possível verificar as mudanças na composição do meio que ocorrem devido às trocas metabólicas realizadas pelo embrião.

A detecção das alterações do meio de cultivo é possível devido à alta sensibilidade e especificidade das novas abordagens de análise. Essas também permitem a avaliação individual dos embriões e, desta forma, é possível associar as eventuais diferenças encontradas nos perfis metabólicos de um embrião com a sua capacidade de manter a gestação após a transferência (Muñoz et al., 2014; Krisher et al., 2015). Essas avaliações podem fornecer dados sobre as vias bioquímicas que o embrião utiliza sob diferentes condições de cultivo, sendo, portanto, uma ferramenta não invasiva interessante para identificação de biomarcadores que permitam uma seleção mais acurada dos embriões.

Em humanos, a busca de marcadores no meio de cultivo embrionário para identificar metabólitos que possam prever a gestação tem sido extensivamente relatada. Autores que avaliaram o meio de cultivo de embriões humanos por métodos não invasivos, utilizando as técnicas de espectrometria como *Near infrared* (NIR) e *Proton nuclear magnetic resonance* (^1H MNR) para estudos de proteômica e metabolômica, em geral, descrevem potenciais biomarcadores. Entretanto, o uso desses marcadores para selecionar embriões ainda não é capaz de aumentar a taxa de nascimento.

Por outro lado, estudos em bovinos avaliando a relação entre o perfil metabólico do meio de cultivo com a capacidade dos embriões implantarem são muito escassos (Muñoz et al., 2014). Muñoz et al. (2014), que avaliaram o meio de cultivo e sua relação com a gestação em bovinos, utilizaram embriões produzidos *in vivo*, os quais foram transferidos para o cultivo *in vitro* por apenas 24 horas e utilizaram a técnica de espectroscopia *Fourier-transform infrared* (FTIR). Portanto, torna-se evidente a necessidade de buscar por um perfil metabólico que valide um biomarcador não invasivo para prenhez, principalmente de embriões PIV, já que esses correspondem a maior parte (73%) dos embriões produzidos no mundo (Viana, 2019).

Considerando que a tendência é que o uso da PIV continue aumentando mundialmente, determinar um método que selecione os melhores embriões a serem transferidos é fundamental para elevar a taxa de gestação e reduzir os custos. Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar o meio de cultivo de embriões bovinos PIV que geraram ou não prenhez usando duas abordagens diferentes: espectrometria de massa com ionização em *eletrospray* (ESI-MS) e fluorimetria, na tentativa de identificar e validar biomarcadores para seleção embrionária.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A menos que seja indicado, todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). A obtenção dos ovócitos e a transferência dos embriões foram realizadas na fazenda Paranã, Formosa, Goiás, Brasil. Todos os procedimentos realizados com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CEUA/CENARGEN) com protocolo N° 004/2017.

2.1 Obtenção dos complexos *cumulus* ovócito e maturação *in vitro*

Os complexos *cumulus* ovócitos (CCOs) foram obtidos de 53 fêmeas bovinas da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*) pela técnica de Ovum pick-up (OPU). Foram realizadas cinco réplicas, sendo utilizadas, em média, 12 doadoras por réplica. Os CCOs recuperados foram selecionados morfológicamente e somente os que apresentavam no mínimo três camadas de células dos *cumulus* e citoplasma homogêneo foram utilizados (n = 676). Os CCOs selecionados de cada doadora foram colocados em tubos de poliestireno com 400 µL do meio de maturação composto de TCM-199 com sais de Earl's (Gibco[®], Burlington, Canadá) suplementado com 0,075 mg/mL de amicacina, 10% de SFB (Gibco[®]), 0,1 mg/mL de L-glutamina, 1 µM de piruvato, 1 µM/mL de cisteamina e 0,01 UI/mL de FSH e cobertos com 250 µL de óleo mineral. Em seguida, os tubos foram transportados em incubadora portátil (Minitub[®], Tiefenbach, Alemanha) até o laboratório, onde foram transferidos para estufa à 38,5°C, 5% CO₂ em ar, onde permaneceram até completar 22-24 horas de maturação.

2.2 Fecundação e cultivo *in vitro*

Após o período de maturação, os CCOs foram transferidos para o meio de fecundação (FEC) composto de Tyrode's albumin lactate pyruvate [TALP] (Parrish et al., 1995) suplementado com 0,5 mM de penicilamina, 0,25 mM de hipotaurina, 25 µM de epinefrina e 10 µg/mL de heparina. Para a fecundação, foi utilizado sêmen criopreservado de um touro da raça Tabapuã, previamente testado para a produção *in vitro* de embriões. Após o descongelamento,

as células espermáticas foram selecionadas por gradiente de *Percoll*[®] conforme Machado et al. (2009), e adicionados na gota de fecundação na concentração final de 1×10^6 espermatozoides / mL. Os ovócitos maturados foram co-incubados com os espermatozoides por 18 horas, sendo o dia da inseminação considerado como dia 0 (D0).

Após a co-incubação, os possíveis zigotos foram gentilmente pipetados para a remoção parcial das células do *cumulus* e transferidos para o meio de cultivo. O cultivo foi realizado em gotas de 150 μ L do meio de fluido sintético de oviduto - SOFaa (Holm et al., 1999) contendo 0,0293 mg/mL de L-glutamina, 0,35 mM de sódio tri-citrato, 2,8 mM de myo-inositol, 8 mg/mL de piruvato, 0,075 mg/mL de amicacina, solução de aminoácidos essenciais (BME 50x), solução de aminoácidos não essenciais (MEM 100x) e 0,4% de BSA suplementado de 10 mg/mL insulina; 5,5 mg/mL transferrina e 5 μ g/mL selênio (BSA+ITS). O cultivo foi realizado em estufa à 38,5°C, 5% CO₂ em ar.

Os embriões foram avaliados no D2 (48 horas pós-inseminação) para clivagem e no D5 (120 horas pós-inseminação) para avaliação do desenvolvimento. No D5, os embriões que estavam no estágio de mórula compacta foram transferidos para o cultivo individual, em novas gotas de 20 μ L do mesmo meio, onde permaneceram até o D7 (168 horas pós-inseminação), totalizando 48 horas de cultivo individual.

No D7 do desenvolvimento embrionário, os embriões foram envasados em estágio de mórula compacta (n = 13), blastocisto inicial (n = 12), blastocisto (n = 35), blastocisto expandido (n = 25) e transferidos para 85 receptoras sincronizadas.

2.3 Coleta do meio de cultivo

Após a avaliação e remoção dos embriões do cultivo individual (D7), uma alíquota de 10 μ L do meio de cada embrião foram coletados em microtubos de polipropileno e armazenados em - 80°C para posterior análise.

2.4 Transferência dos embriões (TE), diagnóstico de gestação e sexagem fetal

As receptoras de embrião (n = 85) foram submetidas à sincronização do estro, conforme o protocolo: no dia zero (D0) foi realizada uma aplicação intramuscular de 2 mL de benzoato de estradiol (Gonadiol[®], Zoetis, São Paulo, Brasil) e a introdução do dispositivo intravaginal com 1g de progesterona (Sincrogest[®], Ouro Fino, Cravinhos, Brasil). No dia 8 (D8) o implante de progesterona foi removido e foram realizadas aplicações intramusculares de 0,5 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio[®], Ouro Fino, Cravinhos, Brasil), 0,3 mg de ciprionato de

estradiol (ECP[®], Zoetis, São Paulo, Brasil) e 1 mL de gonadotrofina coriônica equina (Novormon[®], Zoetis, São Paulo, Brasil).

No dia da TE, as receptoras foram avaliadas por ultrassonografia quanto à presença do corpo lúteo (CL) no ovário, sendo esse o critério para realização da transferência. Os embriões foram transferidos no corno uterino ipsilateral ao CL. O diagnóstico de gestação foi realizado com auxílio de um ultrassom por via transretal utilizando um transdutor linear de 7,5 MHz (Aloka 500. Aloka CO. Ltd. Tokyo, Japão), aos 30 e 60 dias após a TE. A sexagem fetal foi realizada durante o diagnóstico de 60 dias. Após o diagnóstico de gestação aos 60 dias, foram determinados dois grupos: meio de cultivo dos embriões que resultaram prenhez (P) e do meio de cultivo que não resultou em prenhez (NP).

2.5 Extração dos metabólitos

Nas amostras individuais do meio de cultivo dos grupos P e NP adicionou-se metanol à - 20°C na proporção de 1:5 (v:v) em um microtubo de 1,5 mL, seguido de agitação em vórtex por 20 segundos. Posteriormente, as amostras permaneceram por 12 horas em - 20°C. Após esse período as amostras foram então centrifugadas à 20913 x g por 30 min à 4°C. Somente o sobrenadante foi coletado, após a evaporação do solvente os tubos foram armazenados em - 20°C até a análise.

2.6 Espectrometria de massa (ESI-MS)

Em todas as análises do meio de cultivo P (n = 27), NP (n = 54) e perda de prenhez 30-60 dias (n = 4) as amostras que estavam liofilizadas foram então solubilizadas em 100 µL de acetonitrila/H₂O (70:30) com 0,1% de ácido fórmico. Estas foram analisadas em triplicata nas condições de infusão direta em espectrômetro de massa Impact II ESI-Q/TOF (Bruker[®], Bremen, Alemanha) com ionização tipo *eletrospray* (ESI-MS) operando em modo positivo com fluxo de injeção de 250 µL/h, 500 V, 4500 V de capilaridade, 0,5 Bar, 5 L/min de gás em 200°C. Os espectros foram adquiridos por 3 minutos na faixa de massa de 50 - 500 m/z. A fragmentação (MS/MS) dos íons diferenciais entre os espectros dos grupos P e NP foi realizada no modo MRM (Multiple Reaction Monitoring) com janela de isolamento de 2 Da, energia de colisão inicial em 5 e variação até que todo o precursor estivesse fragmentado.

2.7 Quantificação do Piruvato, Lactato e Glutamato

Para quantificar o piruvato, lactato e glutamato, utilizou-se para cada análise 2 μL do meio de cultivo individual de embriões bovinos prenhe, não prenhe e controle. A análise fluorimétrica foi realizada conforme os fabricantes. EnzyChrom Pyruvate Assay (BioAssaySystems[®], Hayward, CA, USA) para o piruvato (n = 64), EnzyFluoTM L-lactate Assay Kit EFLLC-100 (BioAssay Systems[®], Hayward, CA, USA) para o lactato (n = 64) e Amplex[®] Red Glutamic Acid/Glutamate Oxidase Assay Kit (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, USA) para o glutamato (n = 64).

2.8 Análise estatística

Os dados da produção de embrião *in vitro*, prenhez e sexagem fetal foram analisados pelo Qui-quadrado. Os dados brutos gerados a partir do meio de cultivo pelo ESI-MS [massa/carga (m/z) e intensidade do sinal] foram analisados pelos softwares Data Analysis (Bruker[®]) e MetaboAnalyst[®] (www.metaboanalyst.ca). Inicialmente, todos os espectros do grupo prenhe e não prenhe foram processados com tolerância de massa de 0,05 m/z e com isso obteve-se um arquivo desses dados processados. Os dados foram normalizados por soma e transformados em \log_2 . Para as próximas análises, este arquivo foi utilizado para selecionar a faixa de massa de 50 - 550 m/z . Os 50 íons com maior *Fold change* (FC) e valor de p significativo obtido pelo *Volcano plot* foram selecionados para a análise de componentes principais (PCA). Seguido de um modelo de regressão de análise discriminativa de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para obtenção da importância de uma variável na análise de projeção (VIP) e curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para análise do íon como biomarcadores. A concentração de piruvato, lactato e glutamato no meio de cultivo foi obtida com o auxílio da curva padrão. Cada metabólito foi avaliado pela sua relação com a determinação da prenhez para cada estágio embrionário (mórula, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido). O *GraphPad Prism* 8.0 foi utilizado para o teste de detecção de outlier (teste de Grubbs com alfa = 0,05) e para o teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. Para dados de distribuição normal, o teste t de *Student* foi realizado para comparações entre os metabólitos do grupo prenhez e não prenhez. Para os metabólitos que foram diferentes entre os grupos, foi realizada regressão logística e a curva ROC foi usada para ilustrar sua capacidade de prever prenhez ou não prenhez. Para todas as análises, $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

3. RESULTADOS

3.1 Produção *in vitro* de embriões e diagnóstico de gestação

Os resultados da produção de todas as *OPUs* estão apresentados na Tabela 1. Dos 85 embriões transferidos, as taxas de gestação aos 30 e 60 dias assim como o resultado da sexagem fetal são mostrados na Tabela 2.

Tabela 1. Produção *in vitro* de embriões bovinos a partir de complexo *cumulus* ovócitos (CCOs) obtidos pela técnica de *ovum pick up* (OPU) de 12 doadoras. Os embriões foram cultivados em grupos até o dia 5 (D5) do cultivo e apenas aqueles que estavam em estágio de mórula foram cultivados individualmente do D5 até o D7.

OPU	CCOs Viáveis	Nº Clivados (%)	Nº Mc em D5 (%)	Nº embriões D5-D7 (%)	(%) embriões / Mc	Nº prenhez
1	140	128 (91,4)	47 (33,5)	32 (22,8)	68,1	9
2	127	120 (94,4)	49 (38,5)	30 (23,6)	61,2	5
3	134	126 (94,0)	15 (11,2)	12 (8)	80	5
4	135	126 (93,3)	22 (16,3)	8 (5,9)	36,4	5
5	140	123 (87,8)	28 (20,0)	22 (15,7)	78,4	7
Total	676	623 (92,2)	161 (23,8)	104 (15,3)	64,6	31

Mc: mórula compacta

Tabela 2. Número de transferências, diagnóstico de gestação (30 e 60 dias) e sexagem fetal (60 dias) de embriões produzidos *in vitro* e cultivados individualmente entre os dias 5 e 7 do desenvolvimento embrionário.

Embrião*	Nº de TE	Diagnóstico de gestação		Sexagem fetal	
		30 dias (%)	60 dias (%)	Macho	Fêmea
M	13	6 (46,2)	5 (38,5)	3	2
Bi	12	5 (41,7)	5 (41,7)	2	3
BL	35	11 (31,5)	11 (31,5)	8	3
Bx	25	9 (36,0)	6 (24,0)	1	5
Total	85	31 (36,5)	27 (31,8)	14	13

* Mórula Compacta (M); Blastocisto inicial (Bi); Blastocisto (BL); Blastocisto Expandido (Bx). Dados analisados por Qui-quadrado ($p < 0,05$).

3.2 Espectrometria de massa (ESI-MS)

O perfil espectrométrico de todas as amostras ($n = 85$) do meio de cultivo individual de embriões bovinos produzidos *in vitro* dos grupos P e NP, mostraram claramente diferenças entre os grupos. A principal diferença foi a maior intensidade de sinal no grupo prenhe, o qual pode ser observada na faixa de massa 50 - 1500 m/z e, em mais detalhe na 50 - 550 m/z (Figuras 1A e 1B).

Um total de 664692 picos foram detectados no meio de cultivo dos dois grupos, usando a faixa de massa 50 - 1500 m/z , com intervalo de 0,05 m/z . Com a obtenção desses dados processados, a faixa de massa 50 - 550 m/z , que é a faixa referente aos metabólitos (aminoácidos, peptídeos, carboidratos), foi selecionada para as próximas análises. O resultado da análise por *Volcano plot* (Figure 2A) mostrou diversos íons que foram significativos na comparação entre os grupos e, dentre eles, os primeiros 50 íons que foram diferentes significativamente entre os grupos, foram usados para a realização do PCA informativo. A análise de PCA mostrou que foi possível distinguir de forma evidente os íons mais significativos para os grupos prenhe e não prenhe (Figura 2B). Seguindo as análises, o PLS-DA que considera a variação do algoritmo em regressão, mostrou os 15 íons mais importantes com $VIP\ score > 1,22$ (Figura 2C). Estes resultados constituem um painel de íons capaz de diferenciar o meio de cultivo de embriões que geraram ou não prenhez. Os três primeiros íons com maior $vip\ score$ foram validados usando a curva ROC e os íons 156,13 m/z , 444,33 m/z e 305,97 m/z podem ser considerados como biomarcadores. A mesma análise foi realizada para comparar o meio de cultivo de embriões macho e fêmea, porém nenhuma diferença foi encontrada (Figure 4A).

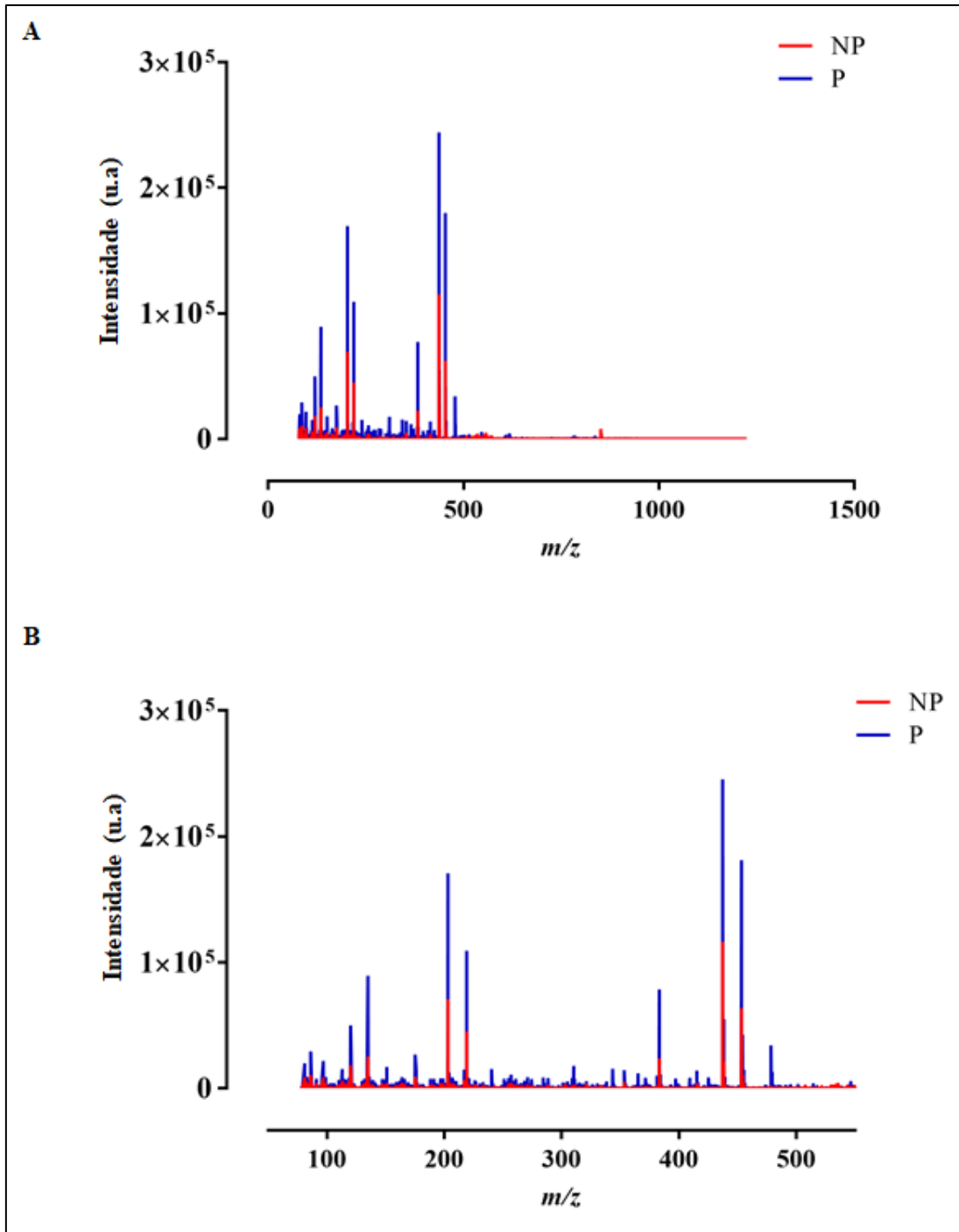


Figura 1. Perfis espectrométricos do meio de cultivo individual (últimas 48 horas) de embriões bovinos produzidos *in vitro* dos grupos prenhe (P - azul), não prenhe (NP - vermelho). Os perfis foram analisados em espectrômetro de massa Impact II ESI-Q/TOF[®] com ionização tipo eletrospray operando em modo positivo. (A) Faixa de massa 50 - 1500 m/z. (B) Faixa de massa 50 - 550 m/z.

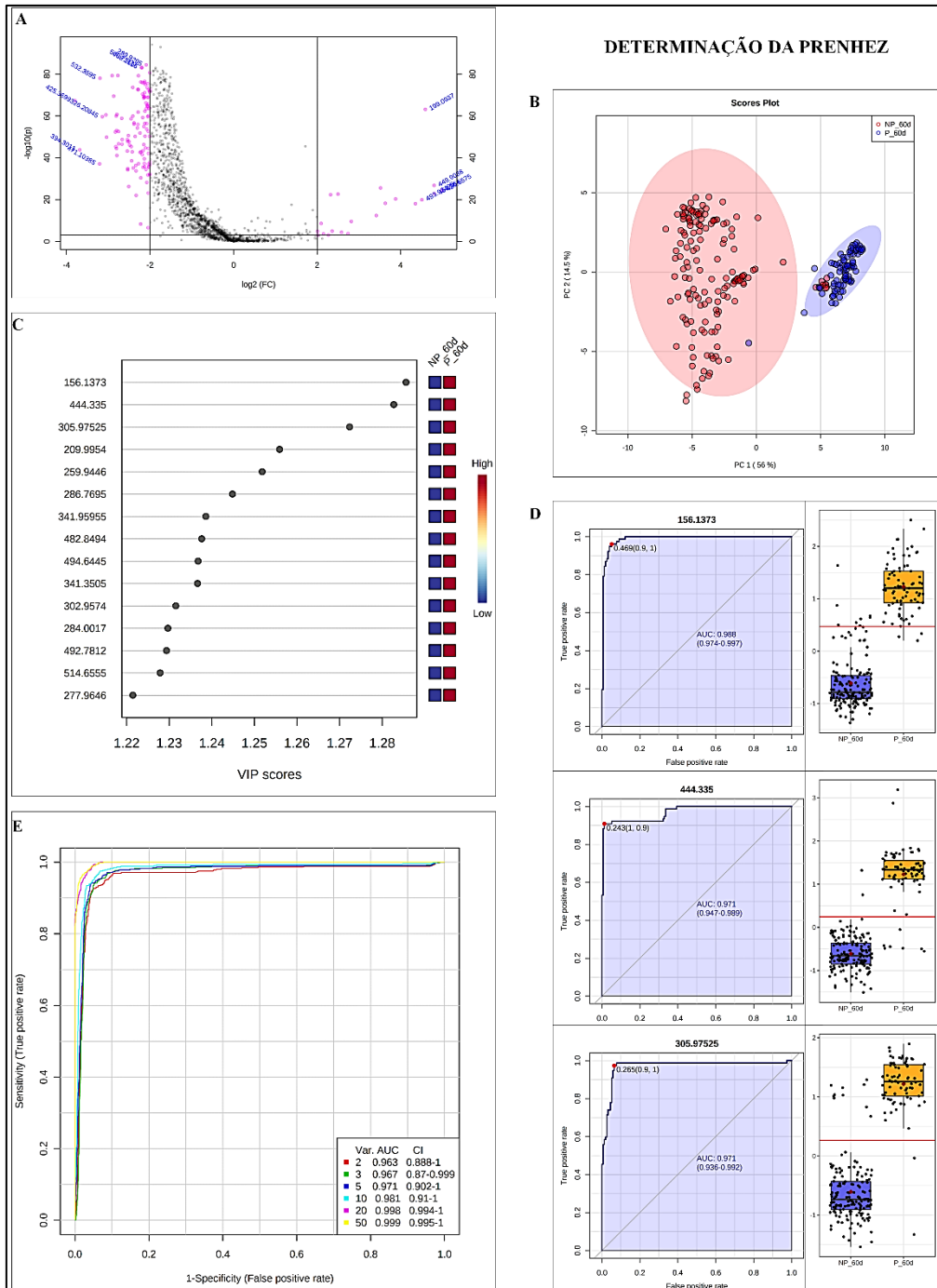


Figura 2. Determinação da prenhez, análise do meio de cultivo individual (D5-D7) de embriões bovinos que geraram ou não prenhez. (A) *Volcano plot* - pontos rosa representam íons sobre o *threshold*, grupo prenhe (lado esquerdo) e grupo não prenhe (lado direito). (B) Análise das componentes principais, em que o grupo prenhe está representado pelos pontos azuis e o grupo não prenhe pelos pontos vermelhos, sendo que a esfera que circunda os grupos representa 95% de intervalo de confiança. (C) Análise discriminativa de mínimos quadrados parciais PLS-DA dos íons com importância variável de projeção (VIP). (D) Representação gráfica (curva *receiver operating characteristic* - ROC) da especificidade e sensibilidade dos íons 156.1373 *m/z*, 444.335 *m/z*, 305.97525 *m/z*, área sob a curva (AUC) em azul. (E) Curva ROC para modelos de biomarcadores conforme o aumento no uso de variáveis (íons).

Além dos dois grupos experimentais correspondentes a prenhez e não prenhez, um terceiro grupo oriundo do meio de cultivo de embriões que deram gestação positiva aos 30 dias, mas negativa aos 60 dias foi formado. Embora houvesse apenas 4 amostras desse grupo, a mesma análise espectrométrica foi realizada e os resultados foram comparados ao grupo prenhe. Os resultados mostraram diferença evidente no perfil metabólico entre os grupos prenhe e os que tiveram perda de prenhez (Figura A1, anexo 1). Essa diferença também foi visualizada ao realizar a análise PLS-DA em que se obteve a formação de dois *clusters* (Figura A2, anexo 1).

3.3 Quantificação fluorimétrica do meio de cultivo

Para avaliar a relação entre os metabólitos nos meios de cultivo e a capacidade do embrião estabelecer uma prenhez, a análise comparou cada metabólito individualmente (piruvato, lactato e glutamato) com todos os estágios embrionários (mórula, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido). Esses metabólitos também foram analisados conforme o gênero do embrião. Considerando os estágios de mórula e blastocisto, bem como o sexo dos embriões, nenhuma diferença na quantificação de metabólitos foi detectada (Figuras 3A, 3B, 3C, 4B e 4C). Quando o estágio de blastocisto inicial foi avaliado, constatou-se que os níveis de glutamato nos meios de cultivo foram maiores no grupo não prenhe ($p = 0,0299$), com área sob a curva (AUC) de 1 ($p = 0,033$) e valores de sensibilidade e especificidade de 100% (Figura 3C e 3D). No entanto, é importante ressaltar que eram poucas as amostras com esse tipo de embrião (Bi) e, que, portanto, mais estudos com esse estágio embrionário são necessários para validar esses dados.

Para o estágio de blastocisto expandido, foram detectados níveis mais altos de piruvato ($p = 0,0174$) e mais baixo de lactato ($p = 0,042$) nos meios de cultivo do grupo prenhe em comparação ao grupo não prenhe (Figura 3A, 3B e 3D). A AUC para o piruvato foi de 0,8295 ($p = 0,0166$) e para o lactato foi de 0,7273 ($p = 0,08$). Para o piruvato, a sensibilidade e a especificidade foram de 90,91% e 75%, respectivamente.

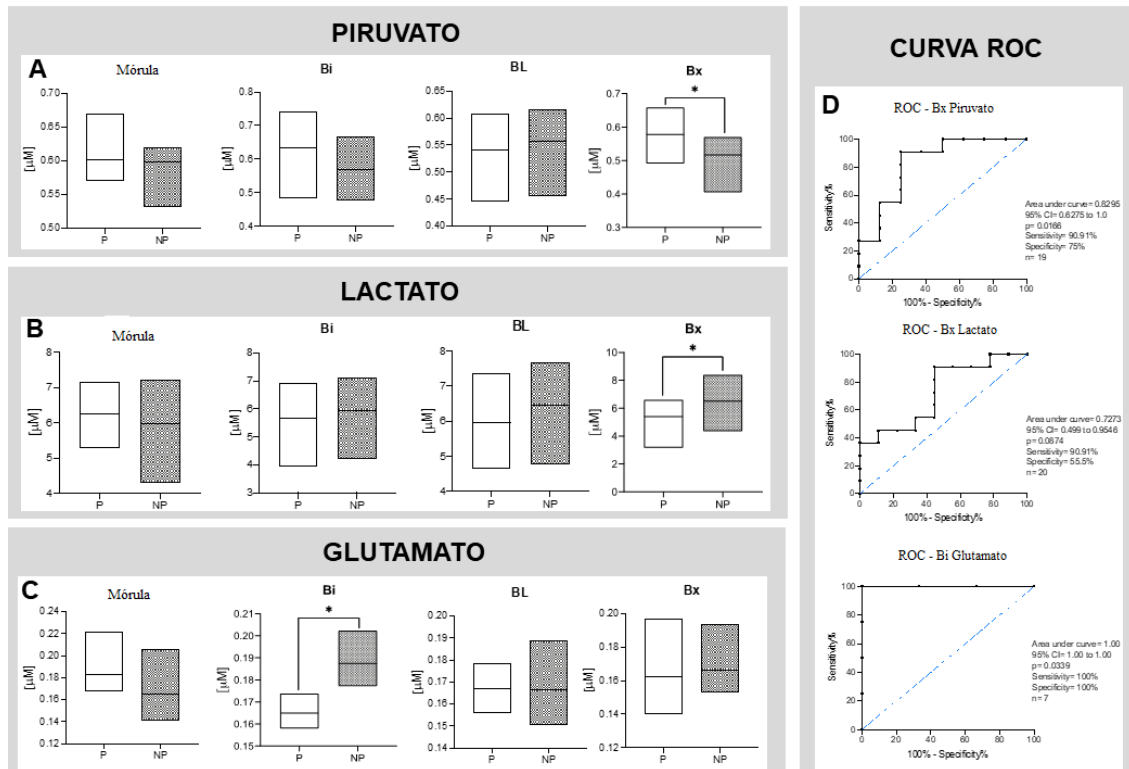


Figura 3. Concentração de piruvato (A), lactato (B) e glutamato (C) no meio de cultivo (D7) de embriões bovinos que geraram (P) ou não geraram (NP) prenhez, nos quatro estágios embrionários (Mórula; Bi - blastocisto inicial; BL - blastocisto; Bx - blastocisto expandido). Dados mostrados em média \pm SEM e * representa $p < 0,05$. (D) Representação gráfica (curva receiver operating characteristic - ROC) da especificidade e sensibilidade de cada metabólito como biomarcador de prenhez. AUC - área sob a curva.

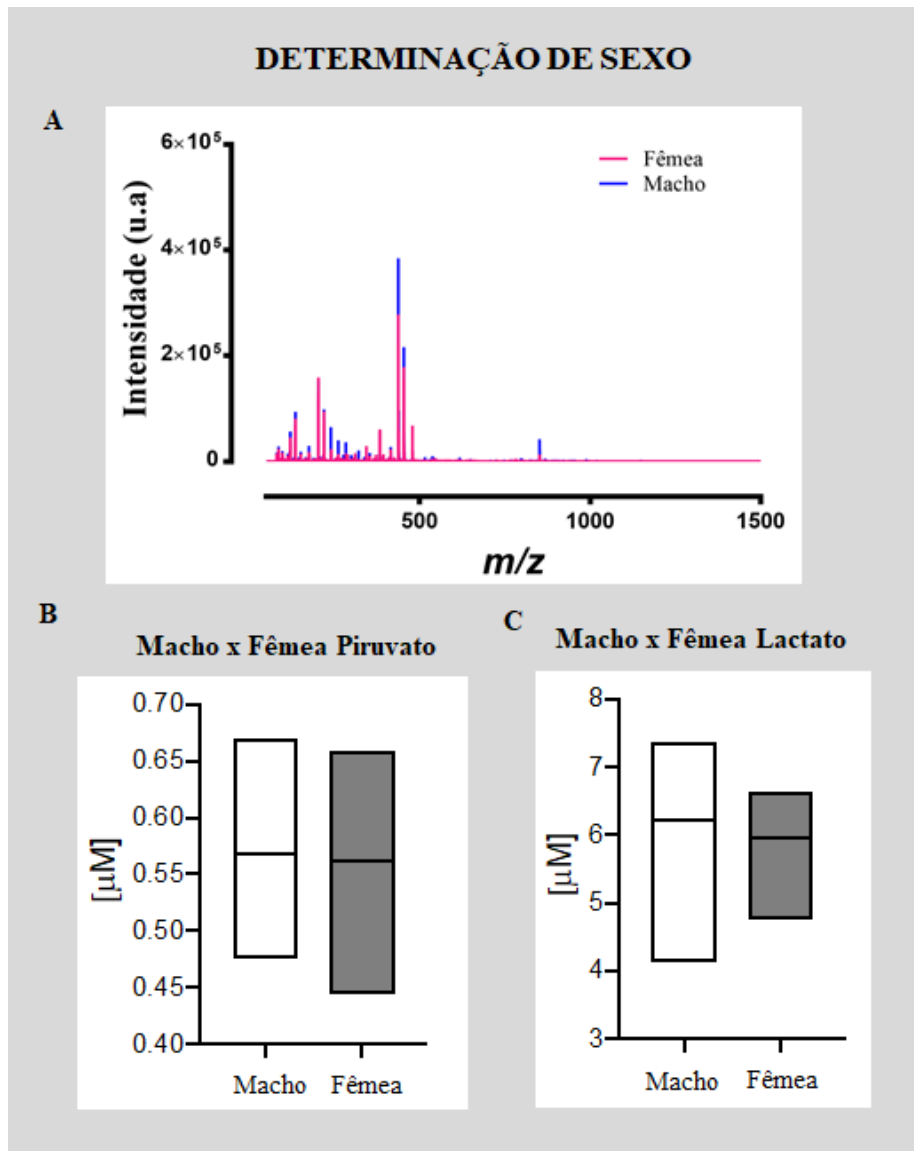


Figura 4. Análise dos metabólitos por gênero. (A) Perfil metabólico das últimas 48 horas do meio de cultivo individual de embriões bovinos macho (azul) e fêmea (rosa) produzidos *in vitro*. Faixa de massa analisa 50 - 1500 m/z . (B) Concentração de piruvato (μM) e lactato (μM) detectado no meio de cultivo de embriões macho e fêmea que geraram prenhez. Dados mostrados em média \pm SEM.

4. DISCUSSÃO

A seleção de embriões com maior capacidade de estabelecer gestação após a transferência ainda é uma limitação nas técnicas de reprodução assistida. A avaliação morfológica é o método mais utilizado e, apesar de ser considerado um indicador de qualidade, não reflete a capacidade de implantação do embrião. Considerando que existe um *crosstalk* entre os embriões e o meio em que são cultivados, é plausível supor que o meio pode refletir seu *status* fisiológico e viabilidade. De fato, se os embriões consomem e secretam certas moléculas no meio de cultivo, esse pode ser uma excelente fonte para identificar possíveis biomarcadores para a seleção embrionária. Portanto, visando identificar biomarcadores no meio de cultivo de embriões foi avaliada a relação entre o perfil metabólico do meio em que embriões PIV foram cultivados e sua subsequente viabilidade pós-transferência.

Os resultados mostraram que a taxa de produção de embriões em D7 foi inferior aos dados relatados na literatura mesmo quando o cultivo é realizado na ausência de soro (Moreno, 2013; Murillo et al., 2017). Essa taxa deve-se, provavelmente, à metodologia utilizada, pois no D5 do cultivo embrionário apenas as mórulas compactas foram selecionadas para o cultivo individual até o D7. Portanto, vários embriões viáveis podem não ter sido selecionados para o cultivo individual por não estarem no estágio esperado no momento da transferência para o cultivo individual.

Já a taxa de prenhez aos 30 (36,5%) e 60 (31,76%) dias foram condizentes com a literatura (Pontes et al., 2011; Cordeiro et al., 2015; Ealy et al., 2019; Reese et al., 2020). Isso demonstra que o cultivo individual realizado nas últimas 48 horas não interferiu na viabilidade do embrião. No diagnóstico de gestação aos 60 dias observou-se cerca de 5% de perda em relação a taxa observada aos 30 dias, o que é semelhante ao 6% de perda relatado na literatura neste período (Inskeep, 2004; Sales et al., 2011). Fatores como qualidade do embrião, mutações genéticas letais, falha no reconhecimento materno, falha na placentação, seleção de receptoras, manejo sanitário, escore de condição corpórea das receptoras são fatores que influenciam as taxas

de perda embrionária ou fetal (Ealy et al., 2019; Reese et al., 2020). Apesar de muitos estudos mostrarem que o cultivo *in vitro* induz uma maior produção de machos do que fêmeas (Xu et al., 1992; Lonergan et al., 1999; Machado et al., 2009; Machado et al., 2013), este viés não foi observado neste estudo, provavelmente por se utilizar a mesma partida de sêmen do mesmo touro em todas as réplicas (Leme et al., 2020). Sendo essa uma característica do animal cujo sêmen foi utilizado para o experimento.

Quando os meios dos grupos prenhe e não prenhe foram analisados por ESI-MS não foi possível detectar íons (m/z) que estivessem presentes em apenas um grupo e não em outro, o que nesse caso, seria a identificação de um excelente marcador. Considerando que as amostras continham embriões com metabolismos e características diferentes era esperado que alguns íons pudessem estar presentes em apenas um dos grupos. A ausência dessa diferença entre os grupos, se deve, provavelmente, a complexidade da amostra. Apesar disso, uma maior intensidade de sinal foi observada no perfil metabólico do grupo prenhe quando comparada ao grupo não prenhe. Essa maior intensidade pode estar relacionada a diferença no metabolismo desses embriões quando comparado aos demais, e/ ou a condição de ionização do meio do grupo prenhe.

Esses resultados sugerem que a diferença na intensidade de sinal entre os grupos pode, por si só, ser considerada um biomarcador de qualidade embrionária, visto que, todas as amostras foram analisadas em triplicata e apresentaram perfis metabólicos muito similares. Mesmo que a estrutura molecular dos íons indicados pela análise VIP não tenha sido identificada, eles também podem ser considerados marcadores preditivos de prenhez, justamente pela consistência dos resultados descritos acima. Apesar do pequeno número de amostras avaliadas no grupo que apresentou gestação aos 30 e perda aos 60, é importante destacar que o perfil metabólico desse grupo e do grupo prenhez também foram diferentes. No entanto, um maior número de amostras deve ser testado para confirmar se esse perfil pode ser usado também como biomarcador para os embriões que apesar de gerar prenhez aos 30 dias não são capazes de mantê-las.

No que se refere ao sexo, os resultados mostraram que nenhuma diferença no perfil metabólico foi detectada no meio de cultivo de embriões macho e fêmea que geraram prenhez, indicando uma similar qualidade metabólica, podendo assumir que os potenciais marcadores não mudam conforme o gênero. Provavelmente, o fato da análise do meio corresponder as últimas 48 horas de cultivo e não aos demais períodos do cultivo e a provável similaridade metabólica, pois ambos resultaram em prenhez, podem ser o motivo deste resultado

divergir dos inúmeros trabalhos da literatura que demonstram diferenças entre embriões macho e fêmea (Rubessa et al. 2011; Ghys et al., 2016; Gómez et al., 2016; Rubessa et al., 2018).

Além das avaliações espectrométricas, o piruvato, lactato e glutamato, foram também quantificados nos meios de cultivo, já que estes compostos são relacionados com a viabilidade do embrião (Lane e Gardner, 2000; Gardner e Wale, 2013; Gardner e Harvey, 2015). Uma maior concentração de piruvato foi encontrada no meio de blastocistos expandidos que geraram prenhez comparado ao não prenhe. Isso sugere que a capacidade de implantação está relacionada com o menor consumo do piruvato em embriões que atingiram o estágio de blastocisto expandido durante as últimas 48 horas de cultivo individual. Como consequência, esses embriões produziram menos lactato para o meio quando comparados aos embriões não prenhes. Esses resultados reforçam a afirmação de que existem diferenças no requerimento de ácidos carboxílicos de acordo com a qualidade do embrião (Gardner et al., 2011), sendo que aqueles que não geram prenhez possuem uma menor oxidação do piruvato levando ao aumento de lactato no meio de cultivo (Lane e Gardner, 2000).

Já o resultado da concentração do glutamato mostrou um maior consumo no meio de cultivo individual do grupo que gerou prenhez de embriões no estágio de blastocisto inicial sendo este resultado similar ao reportado por Seli et al. (2008). A diferença entre os grupos de embrião pode ser resultado do maior requerimento energético no início da formação da blastocelule, como também pode ser devido à capacidade do embrião de reduzir a amônia no meio de cultivo (Seli et al., 2008; Drábková, 2016; Chen et al., 2018; Anchordoquy et al., 2019). O motivo de avaliar o glutamato foi porque sua presença é resultado da conversão da glutamina, presente na maioria dos meios de cultivo embrionário, indicando a utilização desse aminoácido pelo embrião. Além disso, o glutamato que pode ser usado para síntese de outros aminoácidos e antioxidantes também pode indicar a qualidade do embrião. O fato de obter menos glutamato no meio de cultivo de Bi também pode indicar um menor consumo de glutamina por esses embriões que geraram prenhez quando comparado aos que não geraram. Esse resultado está de acordo com a teoria do “*embryo quiet*” (Leese, 2002) que defende que os embriões com o metabolismo menos ativo são os mais viáveis.

A concentração desses metabólitos (piruvato, lactato e glutamato) também foi analisada no meio em que os embriões macho e fêmea foram cultivados. No entanto, nenhuma diferença foi observada, o que difere de vários outros relatos que revelam diferença metabólica entre embriões macho e fêmea (Rubessa et al., 2011; Ghys et al., 2016; Gómez et al., 2016; Rubessa et al., 2018).

Em resumo, os resultados obtidos indicam que é possível prever a prenhez através da análise do perfil metabólico do meio de cultivo de PIV. Mesmo que os íons detectados como diferenciais não tenham sido identificados, a detecção dos íons e a intensidade de sinal presentes no perfil metabólico já podem ser considerados marcadores de prenhez. Da mesma forma que as concentrações de piruvato e lactato presentes no meio de cultivo contendo blastocistos expandidos, constituem marcadores bioquímicos para identificar aqueles com maior potencial de implantação.

5. CONCLUSÃO

O meio de cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* pode ser utilizado na seleção embrionária com valor preditivo de prenhez, utilizando como referência o perfil metabólico adquirido por ESI-MS e a quantificação de piruvato e lactato pela técnica de fluorimetria.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anchordoquy, J. P., R. M. Lizarraga, J. M. Anchordoquy, N. Nikoloff, D. E. Rosa, M. C. Fabra, P. Peral-García and C. C. Furnus (2019). "Effect of cysteine, glutamate and glycine supplementation to *in vitro* fertilization medium during bovine early embryo development." Reproductive biology **19**(4): 349-355.
- Boyama, B. A., I. Cepni, M. Imamoglu, M. Oncul, A. Tuten, M. A. Yuksel, M. E. Kervancioglu, S. Kaleli and P. Ocal (2016). "Homocysteine in embryo culture media as a predictor of pregnancy outcome in assisted reproductive technology." Gynecological Endocrinology **32**(3): 193-195.
- Cordeiro, M. B., M. S. Peres, J. M. de Souza, P. Gaspar, F. Barbieri, M. F. Sá Filho, M. M. Filho, R. N. Dinardi, G. P. Nogueira, F. S. Mesquita, G. Pugliesi, T. Martins, M. Binelli and C. M. B. Membrive (2015). "Supplementation with sunflower seed increases circulating cholesterol concentrations and potentially impacts on the pregnancy rates in *Bos indicus* beef cattle." Theriogenology **83**(9): 1461-1468.
- Chen, P. R., B. K. Redel, L. D. Spate, T. Ji, S. R. Salazar and R. S. Prather (2018). "Glutamine supplementation enhances development of *in vitro*-produced porcine embryos and increases leucine consumption from the medium." Biology of Reproduction **99**(5): 938-948.
- Drábková, P., Andrllová, L., Hampl, R., & Kand'ár, R. (2016). "Amino acid metabolism in human embryos." Physiological research **65**(5).
- Ealy, A. D., L. K. Wooldridge and S. R. McCoski (2019). "BOARD INVITED REVIEW: Post-transfer consequences of *in vitro*-produced embryos in cattle." Journal of Animal Science **97**(6): 2555-2568.
- Gardner, D. K., M. Lane, J. Stevens and W. B. Schoolcraft (2001). "Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential." Fertility and Sterility **76**(6): 1175-1180.
- Gardner, D. K., P. L. Wale, R. Collins and M. Lane (2011). "Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome." Human reproduction (Oxford, England) **26**(8): 1981-1986.
- Gardner, D. K. and P. L. Wale (2013). "Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer." Fertility and Sterility **99**(4): 1062-1072.

- Gardner, D. K. and A. J. Harvey (2015). "Blastocyst metabolism." Reproduction, Fertility and Development **27**(4): 638-654.
- Ghys, E., M. Dallemagne, D. De Troy, C. Sauvegarde, A. Errachid and I. Donnay (2016). "Female bovine blastocysts are more prone to apoptosis than male ones." Theriogenology **85**(4): 591-600.
- Gómez, E., M. Muñoz, C. Simó, C. Ibáñez, S. Carrocera, D. Martín-González and A. Cifuentes (2016). "Non-invasive metabolomics for improved determination of embryonic sex markers in chemically defined culture medium." Journal of Chromatography A **1474**: 138-144.
- Hardarson, T., A. Ahlström, L. Rogberg, L. Botros, T. Hillensjö, G. Westlander, D. Sakkas and M. Wikland (2011). "Non-invasive metabolomic profiling of Day 2 and 5 embryo culture medium: a prospective randomized trial." Human Reproduction **27**(1): 89-96.
- Lesse, J. L. (2012). "Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on." Reproduction **143**(4): 417-427.
- Holm, P., P. J. Booth, M. H. Schmidt, T. Greve and H. Callesen (1999). "High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using sofaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins." Theriogenology **52**(4): 683-700.
- Inskip, E. K. (2004). "Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow^{1,2}." Journal of Animal Science **82**(suppl_13): E24-E39.
- Kirkegaard, K., A. S. P. Svane, J. S. Nielsen, J. J. Hindkjær, N. C. Nielsen and H. J. Ingerslev (2014). "Nuclear magnetic resonance metabolomic profiling of Day 3 and 5 embryo culture medium does not predict pregnancy outcome in good prognosis patients: a prospective cohort study on single transferred embryos." Human Reproduction **29**(11): 2413-2420.
- Krisher, R. L., A. L. Heuberger, M. Paczkowski, J. Stevens, C. Pospisil, R. S. Prather, R. G. Sturmey, J. R. Herrick and W. B. Schoolcraft (2015). "Applying metabolomic analyses to the practice of embryology: physiology, development and assisted reproductive technology." Reproduction, Fertility and Development **27**(4): 602-620.
- Krisher, R. L., W. B. Schoolcraft and M. G. Katz-Jaffe (2015). "Omics as a window to view embryo viability." Fertility and Sterility **103**(2): 333-341.
- Lane, M. and D. K. Gardner (2000). "Lactate Regulates Pyruvate Uptake and Metabolism in the Preimplantation Mouse Embryo¹." Biology of Reproduction **62**(1): 16-22.
- Leme, L. O., J. O. Carvalho, M. M. Franco and M. A. N. Dode (2020). "Effect of sex on cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro*." Theriogenology **141**: 219-227.
- Lonergan, P., H. Khatir, F. Piumi, D. Rieger, P. Humblot and M. P. Boland (1999). "Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos." Reproduction **117**(1): 159-167.

- Machado, G. M., J. O. Carvalho, E. S. Filho, E. S. Caixeta, M. M. Franco, R. Rumpf and M. A. N. Dode (2009). "Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos." *Theriogenology* **71**(8): 1289-1297.
- Machado, G. M., A. R. Ferreira, I. Pivato, A. Fidelis, J. F. Spricigo, F. Paulini, C. M. Lucci, M. M. Franco and M. A. Dode (2013). "Post-hatching development of *in vitro* bovine embryos from day 7 to 14 *in vivo* versus *in vitro*." *Molecular Reproduction and Development* **80**(11): 936-947.
- Moreno, D. (2013). *Development of a serum and BSA free medium for the in vitro culture of bovine embryos.*
- Muñoz, M., A. Uyar, E. Correia, C. Díez, A. Fernandez-Gonzalez, J. N. Caamaño, D. Martínez-Bello, B. Trigal, P. Humblot, C. Ponsart, C. Guyader-Joly, S. Carrocera, D. Martin, B. Marquant Le Guienne, E. Seli and E. Gomez (2014). "Prediction of pregnancy viability in bovine *in vitro*-produced embryos and recipient plasma with Fourier transform infrared spectroscopy." *Journal of Dairy Science* **97**(9): 5497-5507.
- Murillo, A., M. Muñoz, D. Martín-González, S. Carrocera, A. Martínez-Nistal and E. Gómez (2017). "Low serum concentration in bovine embryo culture enhances early blastocyst rates on Day-6 with quality traits in the expanded blastocyst stage similar to BSA-cultured embryos." *Reproductive biology* **17**(2): 162-171.
- Parrish, J. J., A. Krogenaes and J. L. Susko-Parrish (1995). "Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development." *Theriogenology* **44**(6): 859-869.
- Pontes, J. H. F., F. A. Melo Sterza, A. C. Basso, C. R. Ferreira, B. V. Sanches, K. C. P. Rubin and M. M. Seneda (2011). "Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors." *Theriogenology* **75**(9): 1640-1646.
- Reese, S. T., G. A. Franco, R. K. Poole, R. Hood, L. Fernandez Montero, R. V. Oliveira Filho, R. F. Cooke and K. G. Pohler (2020). "Pregnancy loss in beef cattle: A meta-analysis." *Animal Reproduction Science* **212**: 106251.
- Rubessa, M., A. Ambrosi, D. Gonzalez-Pena, K. M. Polkoff and M. B. Wheeler (2018). "Non-invasive nuclear magnetic resonance analysis of male and female embryo metabolites during *in vitro* embryo culture." *Metabolomics* **14**(9): 113.
- Rubessa, M., L. Boccia, G. Campanile, V. Longobardi, S. Albarella, A. Tateo, L. Zicarelli and B. Gasparini (2011). "Effect of energy source during culture on *in vitro* embryo development, resistance to cryopreservation and sex ratio." *Theriogenology* **76**(7): 1347-1355.
- Sakkas, D. and D. K. Gardner (2005). "Noninvasive methods to assess embryo quality." *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* **17**(3).
- Sales, J. N. S., R. V. V. Pereira, R. C. Bicalho and P. S. Baruselli (2011). "Effect of injectable copper, selenium, zinc and manganese on the pregnancy rate of crossbred heifers (*Bos indicus*×*Bos taurus*) synchronized for timed embryo transfer." *Livestock Science* **142**(1): 59-62.

Seli, E., L. Botros, D. Sakkas and D. H. Burns (2008). "Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing *in vitro* fertilization." Fertility and Sterility **90**(6): 2183-2189.

Sugimura, S., T. Akai, Y. Hashiyada, T. Somfai, Y. Inaba, M. Hirayama, T. Yamanouchi, H. Matsuda, S. Kobayashi, Y. Aikawa, M. Ohtake, E. Kobayashi, K. Konishi and K. Imai (2012). "Promising System for Selecting Healthy *In vitro*-Fertilized Embryos in Cattle." PloS one **7**(5): e36627.

Vergouw, C. G., M. W. Heymans, T. Hardarson, I. A. Sfontouris, K. A. Economou, A. Ahlström, L. Rogberg, T. G. Lainas, D. Sakkas, D. C. Kieslinger, E. H. Kosteljik, P. G. A. Hompes, R. Schats and C. B. Lambalk (2014). "No evidence that embryo selection by near-infrared spectroscopy in addition to morphology is able to improve live birth rates: results from an individual patient data meta-analysis." Human Reproduction **29**(3): 455-461.

Vergouw, C. G., D. C. Kieslinger, E. H. Kosteljik, L. L. Botros, R. Schats, P. G. Hompes, D. Sakkas and C. B. Lambalk (2012). "Day 3 embryo selection by metabolomic profiling of culture medium with near-infrared spectroscopy as an adjunct to morphology: a randomized controlled trial." Human Reproduction **27**(8): 2304-2311.

Viana, J. H. (2019). "2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals." Embryo Technology Newsletter **36**(4): 14.

Xu, K. P., B. R. Yadav, W. A. King and K. J. Betteridge (1992). "Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured *in vitro*." Molecular Reproduction and Development **31**(4): 249-252.

ANEXO 1**Figuras suplementares do capítulo 3**

Material suplementar

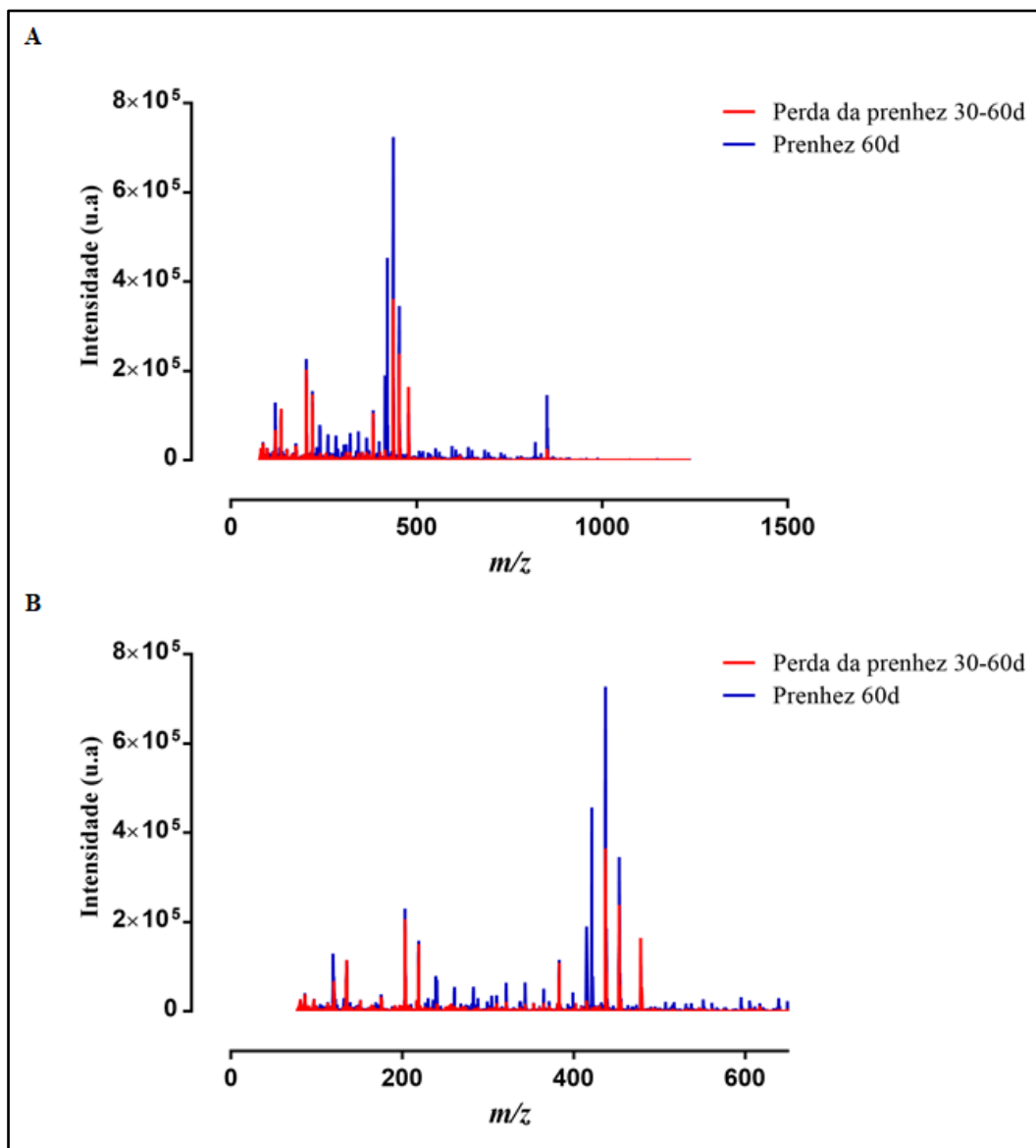


Figura A 1. Perfil metabólico obtido por espectrometria de massa com ionização tipo eletrospray (ESI-MS) em modo positivo, do meio de cultivo dos embriões bovinos produzidos *in vitro*. Em azul grupo prenhe aos 60 dias (P) e em vermelho o grupo que perdeu a prenhez entre 30-60 dias. (A) Faixa de massa analisada 50 - 1500 m/z . (B) Em detalhe o perfil na faixa de massa 50 - 650 m/z . Massa/carga (m/z).

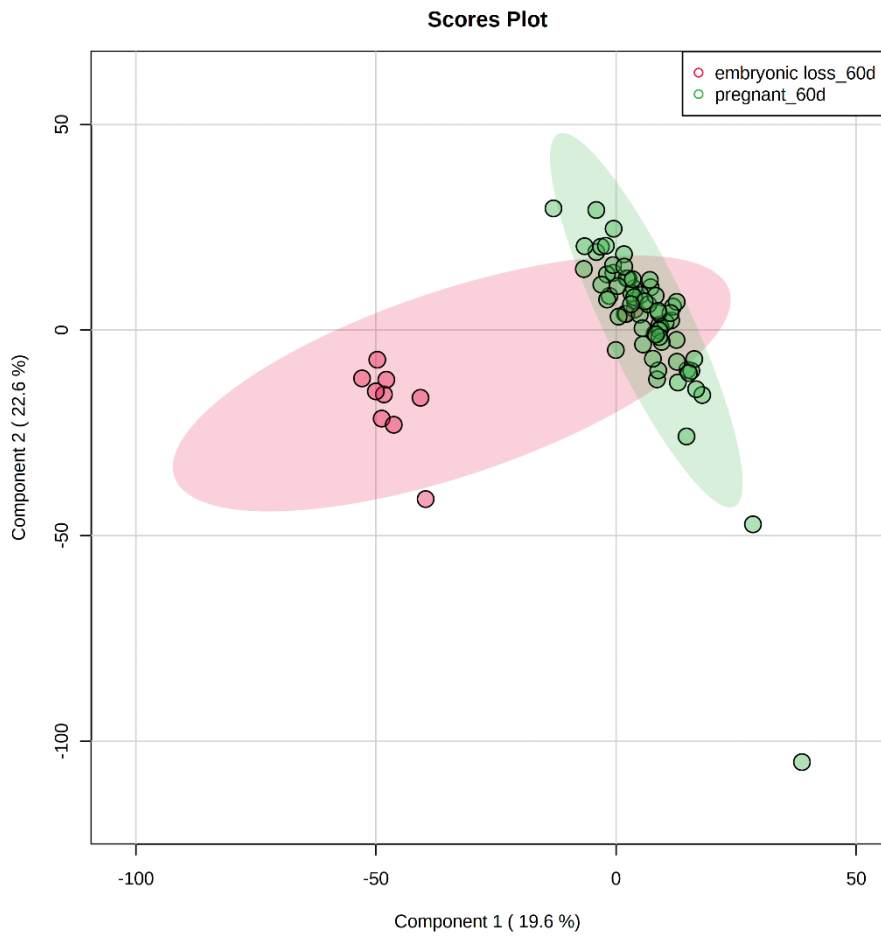


Figura A 2. Análise discriminatória por mínimos quadrados (PLS-DA) do meio de cultivo de embriões bovinos com formação de *clusters* comparando. Grupo prenhe aos 60 dias (verde) e perda de prenhez entre 30-60 dias (vermelho), a elipse que circunda os grupos representa o intervalo de 95% de confiança.

CAPÍTULO 4

Análise do líquido da blastocle por espectrometria de massa tipo *eletrospray* como potencial ferramenta para a seleção de embriões bovinos

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar o perfil metabólico do líquido da blastocelule (LB) obtido de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*. Foram utilizados blastocistos expandidos no dia 7 do desenvolvimento embrionário *in vivo* e *in vitro*. O LB foi coletado de 20 embriões de cada grupo com o auxílio de um micromanipulador e foi analisado sob condições de infusão direta, utilizando um espectrômetro de massa micrOTOF-Q[®] com ionização em *eletrospray*, operando no modo positivo e 50 - 650 m/z a faixa de massa analisada. A espectrometria de massa mostrou uma diferença nos perfis de massa/carga (m/z) e intensidade de sinal entre o LB de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*. Esses diferentes perfis foram muito consistentes entre as amostras de cada grupo, reforçando a ideia de que os fluidos embrionários *in vivo* e *in vitro* seguem um padrão característico e podem ser diferenciados e utilizados para identificar embriões de diferentes origens. O PLS-DA identificou os principais íons com VIP score > 1,55. Estes resultados constituem um painel de íons capaz de diferenciar os LB dos grupos. Os íons 453,15 m/z , 437,18 m/z e 398,06 m/z podem ser considerados biomarcadores da origem embrionária com 100% de sensibilidade e especificidade. Embora não tenha sido possível identificar a identidade molecular dos íons diferenciais, os perfis espectrométricos detectados fornecem uma característica fenotípica consistente e, portanto, capaz de diferenciar embriões produzidos *in vitro* dos *in vivo*, consistindo em um parâmetro de seleção embrionária. Esses resultados mostraram, pela primeira vez, uma diferença evidente entre os perfis metabólicos do LB de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*, utilizando a técnica de espectrometria de massa com ionização *eletrospray* (ESI-MS).

Palavras-chave: biomarcador, blastocisto, *eletrospray*, *in vivo*, *in vitro*

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the metabolic profiles of blastocoel fluid (BF) obtained from bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. Expanded blastocysts on day 7 of *in vivo* and *in vitro* development of bovine embryos were used. BF was collected from 20 embryos from each group with the aid of a micromanipulator, and were analyzed under direct infusion conditions, using a microTOF-Q[®] mass spectrometer with electrospray ionization operating in positive mode and 50 - 650 *m/z* mass range. The spectrometry showed an evident difference in the mass/charge (*m/z*) and signal intensity profiles between the BF of embryos produced *in vivo* and *in vitro*. These different profiles were very consistent between the samples of each group and reinforce the idea that embryo fluids *in vivo* and *in vitro* follow a certain pattern that can be differentiated and, thus, used to identify the embryo's origin. The PLS-DA showed the principal ions with VIP *score* > 1.55. These results constitute a panel of differential ions that enable one to distinguish the *in vivo* BF from *in vitro* BF. The ions 453.15 *m/z*, 437.18 *m/z* and 398.06 *m/z* can be considered biomarkers for embryo's origin with 100% of sensitivity and specificity by ROC analysis. Although it was not possible to unveil the molecular identity of the differential ions, the resulting spectrometric profiles provide a characteristic phenotype always observed and therefore able to differentiate embryos produced *in vitro* of the *in vivo* and hence constitute a parameter for embryo selection. As far as we know, our results showed, for the first time, an evident difference between the spectrometric profiles of the BF from bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*.

Key words: biomarker, blastocyst, electrospray, *in vivo*, *in vitro*

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotécnica bem estabelecida comercialmente e, rotineiramente utilizada para acelerar a multiplicação de animais melhoradores, conforme as características zootécnicas desejadas. Além disso, tem sido utilizada na preservação de animais e, recentemente, como ferramenta em abordagens mais inovadoras como a seleção genômica e a edição gênica. O uso da PIV em bovinos tem crescido mundialmente, sendo atualmente responsável por mais de 70% do total de embriões transferidos (Viana, 2019).

Apesar dos avanços obtidos nas últimas décadas, esta biotécnica ainda apresenta algumas limitações que restringem seu uso. Um dos fatores limitantes não é a quantidade, mas sim a qualidade do embrião produzido *in vitro*, o que reduz o seu desenvolvimento, implantação e nascimento. Tanto que cerca de 60% dos embriões bovinos produzidos *in vitro* transferidos não conseguem estabelecer e manter a gestação até o nascimento (Ealy et al., 2019).

A perda embrionária e fetal ocorre, em parte, devido a menor qualidade desses embriões. Tem sido extensivamente relatado que embriões produzidos *in vitro* são diferentes dos *in vivo* em várias características como, por exemplo, número de células totais, número de células apoptóticas (Corcoran et al., 2006), tolerância à criopreservação (Fair et al., 2001; Rizos et al., 2002; Sudano et al., 2012), quantidade de lipídeos (Sudano et al., 2012) e no perfil transcricional (Corcoran et al., 2006; Machado et al., 2013; Noguchi et al., 2020). Todas essas diferenças se devem às condições artificiais de cultivo que os embriões *in vitro* são expostos.

Portanto, existe a necessidade de se desenvolver metodologias mais objetivas para selecionar somente os embriões que possuem maior potencial de implantação e de nascimento, pois a seleção atual baseada em características morfológicas não é capaz de prever este potencial (Peterson e Lee, 2003; Muñoz et al., 2014). Desta forma, o uso de técnicas não

invasivas que são capazes de identificar quais embriões devem ser transferidos, tem sido um objeto de grande interesse para os embriologistas.

Dentre as atuais metodologias não invasivas ao embrião, as mais promissoras incluem as avaliações de metabólitos, microRNAs e DNA livre de célula (cfDNA) presentes no meio de cultivo (Seli et al., 2010; Henry, 2012; Juliano et al., 2018; Vera-Rodriguez et al., 2018). Entretanto, até o momento, nenhum marcador que indique com segurança a qualidade dos embriões foi identificado no meio de cultivo. Em humanos, uma alternativa que tem sido avaliada para identificar algum possível marcador é o uso do líquido da blastocele (LB). Palini et al., (2013) detectaram a presença de material genético no LB de embriões humanos e vários autores defendem que apesar de manipular o embrião, a remoção do LB é menos invasiva do que a biópsia e pode ser considerada uma nova alternativa para identificar embriões de melhor qualidade (Gopichandran e Leese, 2003; D'alessandro et al., 2012; Jensen et al., 2012; Leaver e Wells, 2019).

O LB é constituído predominantemente por água e depende do sistema de transporte de íons das células apolares do trofotoderma. O trofotoderma é responsável por regular os eventos iniciais da cavitação através da expressão de genes que facilitam o transporte e a retenção do líquido da blastocele (Barcroft, 2001). Os componentes da massa celular interna e das células do trofotoderma, incluindo vários tipos de proteínas (Jensen et al. 2014) e outras moléculas (Farra et al. 2018) são transportadas para o líquido. Sabe-se que o LB possui um papel fundamental durante a pré-implantação, sendo seus componentes utilizados na formação do saco vitelínico. Por isso, sua composição está diretamente relacionada com o suporte ao desenvolvimento do blastocisto inicial, podendo refletir a fisiologia e, conseqüentemente, a qualidade do embrião (Jensen et al., 2014; Magli et al., 2016).

Estudos em humanos relatam que o DNA presente no LB pode ser amplificado e quantificado, evidenciando uma potencial abordagem para a realização de testes genéticos pré-implantacionais (Tobler et al., 2015; Hammond et al., 2016; Magli et al., 2016; Zhang et al., 2016; Rule et al., 2018). Por se tratar de uma nova abordagem, mais estudos são necessários e por isso seu uso ainda não é recomendado para a triagem genética (Kuznyetsov et al., 2018; Li et al., 2018; Tšuiiko et al., 2018).

Em animais domésticos, a maioria dos estudos sobre o LB estão relacionados a processos de criopreservação, pois a presença desse líquido desfavorece a taxa de sobrevivência do embrião devido à formação de cristais de gelo durante o procedimento (Vajta e Kuwayama, 2006). As pesquisas abordam a remoção do LB antes dos processos de criopreservação para aumentar a viabilidade dos embriões após o descongelamento. Essa abordagem já foi relatada

com sucesso em embriões bovinos (Min et al., 2014), equinos (Diaz et al., 2016), murinos (Kazemi et al., 2016) e felinos (Ochota et al., 2017). No caso da criopreservação, o LB é retirado e descartado, sem que nenhuma investigação ou uso desse conteúdo seja realizada.

Apesar de alguns estudos terem avaliado a composição do LB em bovinos, quantificando as concentrações de glicose, piruvato, lactato e aminoácidos (Gopichandran e Leese, 2003) e algumas proteínas (Jensen et al., 2014), esses são muito escassos. A falta de estudos nessa área se deve, provavelmente, ao pouco volume obtido de cada embrião e a dificuldade de obtenção, manipulação e análise de um volume tão pequeno (D'alessandro et al., 2012; Jensen et al., 2014; Tedeschi et al., 2017). Entretanto, com o uso cada vez mais frequente de equipamentos com maior sensibilidade e especificidade, como, por exemplo, a espectrometria de massa, o pouco volume adquirido da amostra já permite a execução da análise, inclusive sem a necessidade da formação de *pools*. Diante disso, o uso do LB para avaliar a qualidade dos embriões torna-se viável e pode ser associado a outras técnicas de reprodução assistida, como a criopreservação dos embriões, incrementando a eficiência da PIV.

Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar o perfil metabólico do LB de embriões bovinos produzidos *in vitro* e *in vivo*, por espectrometria de massa tipo *eletrospray*, buscando identificar potenciais biomarcadores de qualidade embrionária.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A menos que seja indicado, todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). O uso de animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CEUA/CENARGEN) com o protocolo N° 004/2017.

2.1 Produção *in vitro* de embrião (PIV)

Os ovários foram coletados em abatedouros e transportados ao laboratório em solução salina (NaCl, 0,9%) suplementada com amicacina (250 µg/mL), a 35°C. Os folículos com tamanho de 3 a 8 mm foram aspirados utilizando seringa de 10 mL e agulha caibre 18 G. Somente os complexos *cumulus* ovócitos (CCOs) com no mínimo três camadas de células do *cumulus* e com citoplasma homogêneo foram utilizados.

Após a seleção, grupos de 25 a 30 CCOs foram transferidos para gotas de 150 µL do meio de maturação composto de TCM-199 com sais de Earl's (Gibco BRL, Burlington, Canadá) suplementado com 0,075 mg/mL de amicacina, 10% de SFB (Gibco®), 0,1 mg/mL de L-glutamina, 1 µM de piruvato, 1 µM/mL de cisteamina e 0,01 UI/mL de FSH e incubados por 22-24 horas em estufa a 38,5°C, 5% de CO₂ em ar.

Após o período de maturação, os CCOs foram transferidos para o meio de fecundação (FEC) composto de *Tyrode's albumin lactate pyruvate* [TALP] (Parrish et al., 1995) suplementado com 0,5 mM de penicilamina, 0,25 mM de hipotaurina, 25 µM de epinefrina e 10 µg/mL de heparina. Em todas as réplicas foi utilizado o sêmen do mesmo touro da raça Nelore com fertilidade conhecida. Após o descongelamento do sêmen em banho maria a 37°C por 30 segundos, as células espermáticas foram selecionadas por gradiente de *Percoll*® conforme descrito por Machado et al., (2009). Os espermatozoides foram adicionados na gota de fecundação à concentração final de 1 x 10⁶ espermatozoides/mL. Os ovócitos maturados foram

co-incubados com os espermatozoides por 18 horas, sendo o dia da inseminação considerado como dia 0 (D0).

Após a co-incubação, os potenciais zigotos foram gentilmente pipetados para a remoção parcial das células do *cumulus* e transferidos para o meio de cultivo. O cultivo foi realizado em gotas de 150 μ L de meio SOFaa (Holm et al., 1999) contendo 0,0293 mg/mL de L-glutamina, 0,35 mM de sódio tri-citrato, 2,8 mM de myo-inositol, 8 mg/mL de piruvato, 0,075 mg/mL de amicacina, solução de aminoácidos essenciais (BME 50x), solução de aminoácidos não essenciais (MEM 100x) suplementado de 0,4% de albumina sérica bovina (BSA) com 10 mg/mL insulina; 5,5 mg/mL transferrina e 5 μ g/mL selênio (BSA+ITS). O cultivo foi realizado em 20 % O₂ à 38,5 ° C.

Os embriões foram avaliados no D2 (48 horas pós-inseminação) para clivagem e no D6 (144 horas pós-inseminação) e no D7 (168 horas pós-inseminação), para avaliação do desenvolvimento embrionário. Os embriões que se encontravam no estágio de blastocisto expandido (Bx) no D7 foram utilizados para a coleta do LB.

2.2 Produção *in vivo* de embrião

Para a produção *in vivo* de embriões, vacas doadoras (n = 15) da raça Nelore (*Bos Taurus Indicus*) foram submetidas à superestimulação ovariana. No dia 0 (D0) da sincronização, os animais receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (1 g; Sincrogest[®] Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil) e 2 mg de benzoato de estradiol (RIC-BE[®], Tecnopec Ltda, São Paulo, Brasil). No dia quatro (D4), os animais foram superestimulados com 100 mg de FSH (Folltropin-V[®]; Vetoquinol N.-A. Inc, QC, Canadá) em doses decrescentes, recebendo duas aplicações por dia ao longo de quatro dias (12/12 horas). Junto com a quinta aplicação do FSH induziu-se a luteólise com 500 mg de PGF2 α (500mg de Cloprostenol; Estron[®], União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil). Na sexta aplicação do FSH removeu-se o dispositivo intravaginal de progesterona e doze horas após foi administrado (i.m) 50 mg de análogo de GnRH (Lecirelina; Gestran[®] ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina). Doze e vinte e quatro horas após a indução da ovulação, os animais foram inseminados com a mesma partida do touro utilizado na produção dos embriões *in vitro*. Após sete dias da inseminação, os embriões foram coletados por lavagem uterina e aqueles que estavam em estágio de Bx foram utilizados para o experimento.

2.3 Coleta do líquido da blastocele (LB)

Somente os Bx foram utilizados para a coleta do LB de ambos os grupos. Para evitar a contaminação cada embrião *in vitro* e *in vivo* foi lavado e micromanipulado em gotas individuais de 30 μ L de solução salina tamponada de fosfato (PBS) e cobertos com óleo mineral. Todo o procedimento foi realizado em placa de Petri de 100 mm. Para a coleta do LB, foi necessário a utilização de duas pipetas de vidro acopladas a um micromanipulador, uma para o embrião ser fixado (pipeta *holding*) e, a outra com diâmetro interno de aproximadamente 5 μ m para aspirar o líquido. A pipeta de aspiração foi gentilmente pressionada contra a zona pelúcida até atingir a cavidade do embrião, quando o líquido foi totalmente aspirado (Figura 1). Em seguida, o líquido foi depositado em uma gota, já preparada na placa de micromanipulação, contendo 3 μ L de água deionizada. Ao término da micromanipulação, a gota contendo o LB foi coletada e armazenada individualmente em microtubos de 200 μ L a - 80°C até a realização das análises.

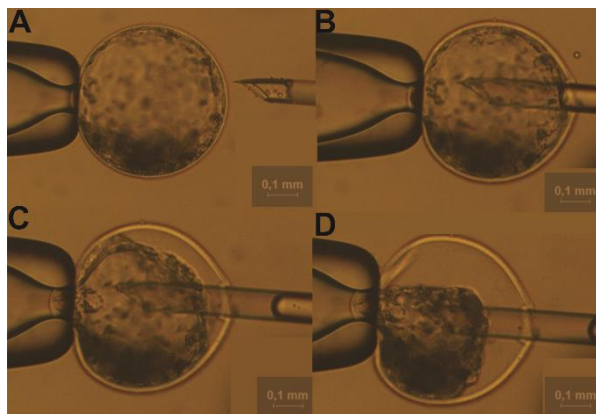


Figura 1. Coleta do líquido da blastocele de blastocisto expandido bovino D7 (20x). (A) Blastocisto expandido intacto antes da coleta. (B) A micropipeta é introduzida na blastocele para iniciar a coleta do líquido. (C) aproximadamente 30% do líquido coletado. (D) Coleta completa do líquido da blastocele.

2.4 Espectrometria de Massa (MS)

As amostras do LB armazenadas individualmente dos grupos *in vivo* (n = 20) e *in vitro* (n = 20) foram descongeladas e, 50 μ L de solução de acetonitrila/H₂O (50:50) com 0,1% de ácido fórmico foi adicionada em cada amostra. Procederam-se então as análises nas condições de infusão direta, em espectrômetro de massa micrOTOF-Q® (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) com ionização tipo *eletrospray* operando em modo positivo com fluxo de injeção de

180 $\mu\text{L/h}$, 8 V de energia de colisão, 500 V, 4500 de capilaridade, 0,6 Bar de pressão, 5 L/min de gás em 180°C. Os espectros foram adquiridos na faixa de 50 - 650 m/z . A fragmentação (MS/MS) dos íons que apresentaram diferenças entre os espectros dos grupos *in vivo* e *in vitro* foram realizadas no modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) com janela de isolamento de 2Da, energia de colisão começando em 5v e variando até que todo o íon precursor fosse fragmentado.

Os espectros foram adquiridos com auxílio do programa *oTOFcontrol*[®] e o software *Data Analysis*[®] foi utilizado para analisar os perfis dos LB dos embriões *in vivo* e *in vitro*.

2.5 Análise estatística

Os dados brutos gerados a partir do ESI-MS [massa/carga (m/z) e intensidade do sinal (I)] foram analisados usando o software Data Analysis (Bruker[®]) e MetaboAnalyst versão 4.0 (www.metaboanalyst.ca). Inicialmente, todos os espectros dos grupos *in vitro* e *in vivo* foram processados com uma tolerância de massa de 0,05 m/z para processar os dados do arquivo. Então, os dados foram normalizados por soma e transformação de raiz cúbica. A fim de fornecer uma visão geral preliminar dos dados, o gráfico de Volcano plot com *threshold* 4 foi executado. Posteriormente, o modelo de regressão multivariada de análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para importância variável na projeção (VIP) foi aplicado. Para os íons que foram diferentes entre os grupos, realizou-se regressão logística e curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para ilustrar sua capacidade de discernir o LB *in vitro* do *in vivo*. Para todas as análises, $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS

ESI-MS mostrou diferença na massa/carga (m/z) e intensidade de sinal entre o LB de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* (Figura 2). Um total de 6119 picos de todas as amostras foram obtidos usando a faixa de massa de 50 - 650 m/z . O gráfico do *Volcano plot* diferenciou os grupos e identificou os principais íons (Figura 3A). A análise de componentes principais (PCA) foi capaz de distinguir os grupos em clusters (Figura 3B). Após, foi realizado o PLS-DA, em que foram identificados os principais íons com $VIP > 1,55$ (Figura 4A). Esses resultados constituem um painel de íons capaz de diferenciar o LB de diferentes origens. Os íons 453,15 m/z ; 437,18 m/z ; 398,06 m/z foram selecionados para uma análise individual de biomarcador pela curva ROC. Os resultados da curva ROC mostraram 100% de especificidade e sensibilidade, comprovando esses íons como biomarcadores de origem do embrião (Figura 4B). A Figura 4C mostra em detalhes o perfil espectrométrico dos biomarcadores. Realizou-se a fragmentação (MS/MS) desses íons com o objetivo de identificá-los, porém sem sucesso.

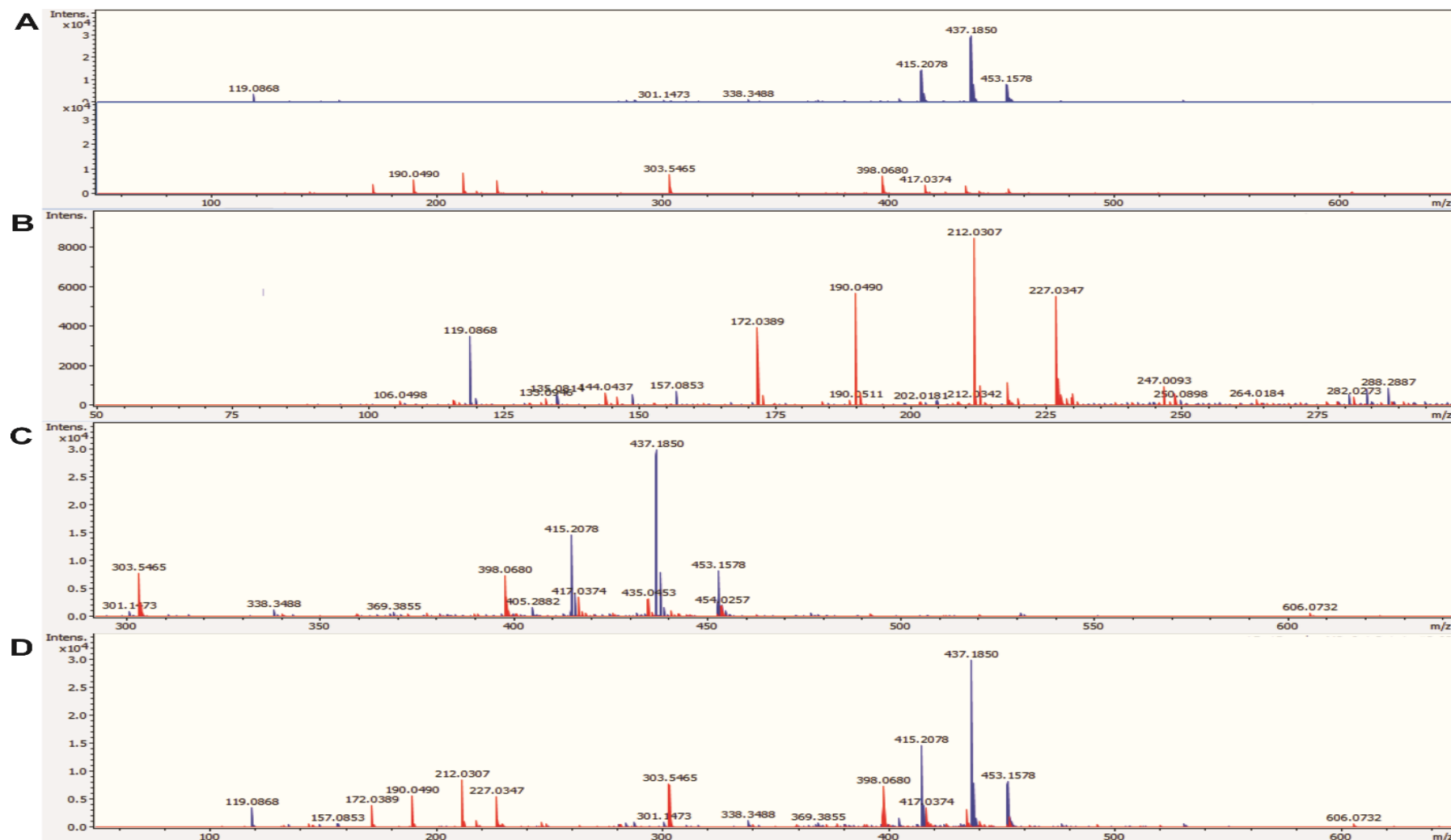


Figura 2. Perfil espectrométrico representativo do líquido da blastocle (LB) de blastocistos expandidos bovino *in vivo* (azul) e *in vitro* (vermelho) no dia sete (D7) de desenvolvimento embrionário. (A) *in vivo* (acima) e *in vitro* (abaixo). (B) *in vivo* e *in vitro* com faixa de massa de 50 - 300 m/z; (C) *in vivo* e *in vitro* com faixa de massa de 300-650 m/z; (D) *in vivo* e *in vitro* com faixa de massa de 50-650 m/z.

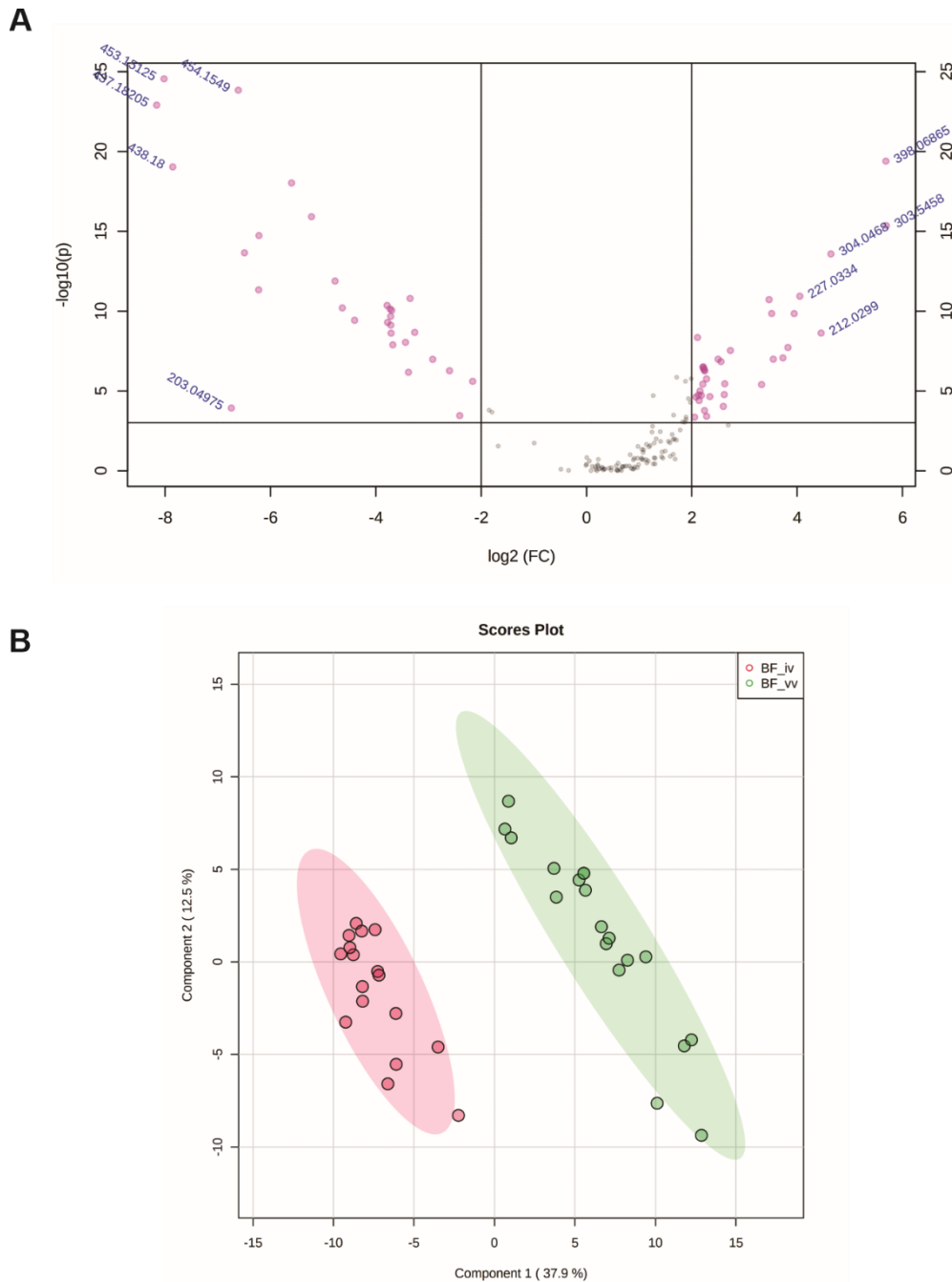


Figura 3. (A) Gráfico de Volcano plot dos íons do líquido da blastocelule *in vivo* e *in vitro* com Fold Change (FC) > 4 e $p \leq 0,05$ (pontos rosa). Os dez íons identificados, cinco íons à esquerda (grupo *in vivo*) e cinco íons à direita (grupo *in vitro*) representam aqueles com maior FC e menor valor de p . (B) A análise discriminatória de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) mostra o gráfico de pontuação 2-D entre o líquido da blastocelule *in vivo* (vermelho) e *in vitro* (verde). As elipses representam um intervalo de confiança de 95%.

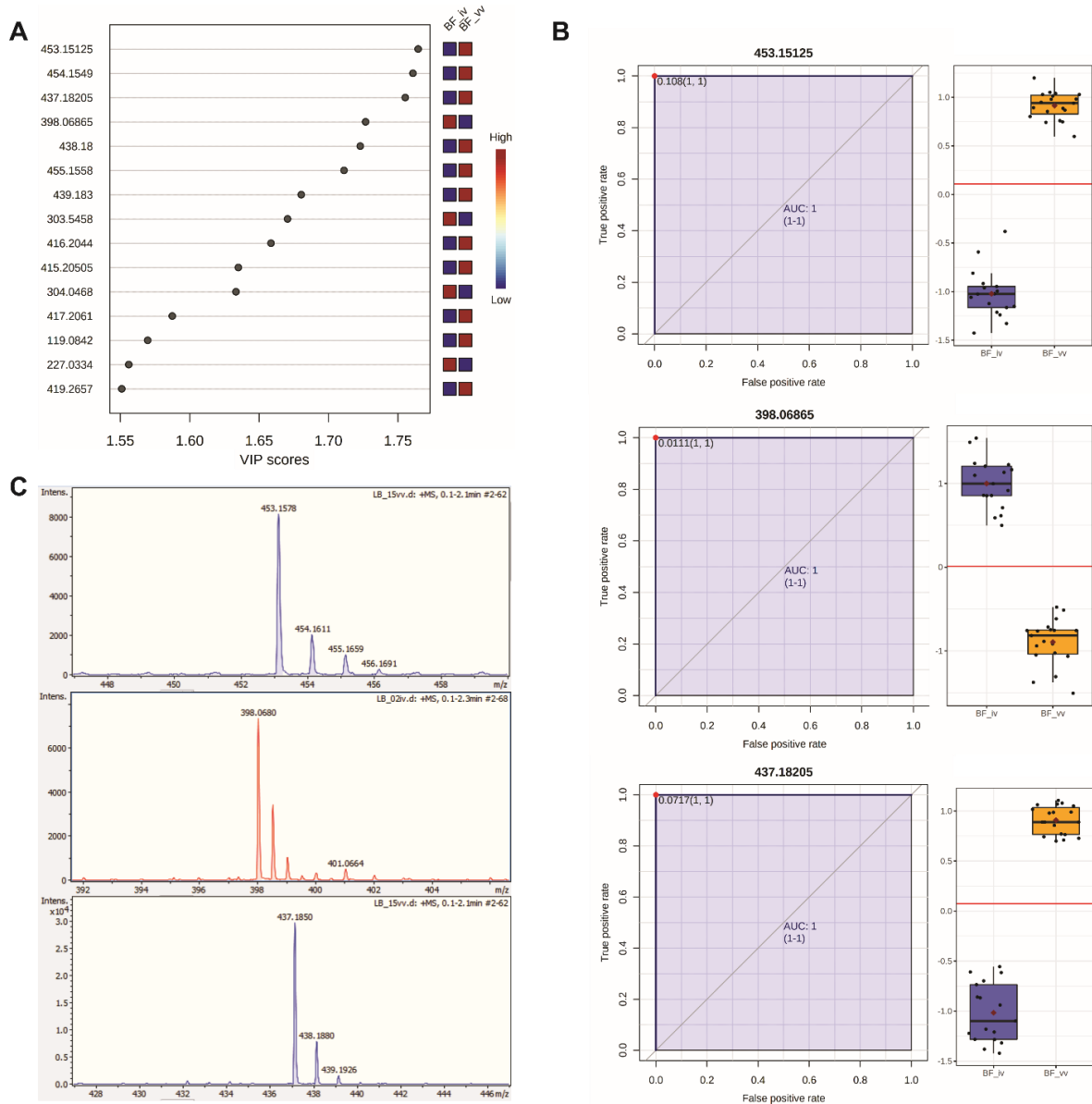


Figura 4. Análises do líquido da blastocela de embriões bovinos *in vivo* e *in vitro*. (a) Variável de importância em projeção (VIP) *score* dos íons obtidos pela análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA). (b) Representação gráfica (curva *receiver operating characteristic* - ROC) da especificidade e sensibilidade dos íons mais relevantes como biomarcador de prenhez. AUC - área sob a curva em azul e seus respectivos gráficos em *box plot* (c) Espectros representativos do líquido da blastocela dos íons. 453,1694 *m/z*; 398,068 *m/z* e 437,1820 *m/z*. Massa/carga (*m/z*).

4. DISCUSSÃO

Considerando que o LB desempenha um papel importante durante o desenvolvimento embrionário, participando dos processos de diferenciação e autorrenovação celular, foi levantada a hipótese que os compostos presentes no LB podem refletir a qualidade do embrião. Para testar a hipótese, foram utilizados embriões produzidos *in vivo*, considerados de melhor qualidade, e embriões produzidos *in vitro*, de qualidade inferior. O LB obtidos das duas categorias de embriões no mesmo dia e no mesmo estágio de desenvolvimento foi utilizado para análise do perfil espectrométrico.

Os resultados mostraram que os perfis espectrométricos entre o LB de embriões produzidos *in vitro* e *in vivo*, foram claramente distintos sugerindo diferenças entre eles no metabolismo fisiológico. Essa diferença entre os perfis foi consistente, visto que as 20 amostras de cada grupo foram semelhantes. Essa alta repetibilidade reforça a ideia de que os fluidos de embriões *in vitro* e *in vivo* seguem um certo padrão e que pode ser diferenciado e, desta forma, utilizado para identificar diferentes tipos de embriões.

Apesar da tentativa de identificar os compostos relacionados aos íons diferenciais, isso não foi possível, pois nenhuma correspondência para os espectros de MS / MS foi encontrada nos bancos de dados. No entanto, os resultados obtidos constituem um painel de íons diferenciais que permitem distinguir o LB de embriões *in vivo* do LB *in vitro*. Os íons 453,15 Da $[M + H]^+$, 437,18 Da $[M + H]^+$ e 398,06 Da $[M + H]^+$ podem ser considerados como biomarcadores para a origem do embrião, com 100% de sensibilidade e especificidade por meio de análise ROC. É importante destacar também que o íon 437,1820 Da $[M + H]^+$, presente apenas no LB de embriões produzidos *in vivo*, também foi detectado em outro estudo deste grupo de pesquisa, em meio de cultivo de embriões PIV. Isso indica que o composto relacionado ao íon 437,1820 Da $[M + H]^+$, que estava presente no meio, não poderia ser produzido pelos embriões *in vitro* nem ser internalizado por eles, que de outra forma estariam presentes no LB dos embriões *in vitro*.

Portanto, entender a importância e o motivo pelo qual esse íon está presente apenas no LB de embriões *in vivo*, que é rotineiramente usado como padrão de qualidade embrionária, pode ser fundamental para melhorar a qualidade dos embriões produzidos *in vitro*.

Estudos com LB em embriões humanos tem relatado que seu uso representa uma alternativa interessante para a realização de testes de pré-implantacionais (Hammond, et al., 2016; Magli et al., 2019; Magli, et al., 2016). Isso porque, a aspiração do LB é considerada menos invasiva para o embrião e, parece ter um alto valor preditivo e maior conformidade com as ploidias cromossômicas quando comparado ao uso do corpúsculo polar, blastômeros e/ou células do trofotoderma (Gianaroli et al., 2014; Magli, et al., 2016). No entanto, apenas recentemente, foram relatadas tentativas de correlacionar a presença de DNA no LB com o potencial de implantação em embriões humanos (Li, et al., 2018; Magli, et al., 2019).

Além disso, em estudos envolvendo análises proteômicas de LB de humanos e bovinos, foi possível identificar um total de 286 e 23 proteínas respectivamente (Jensen, et al., 2012; Jensen, et al., 2014). Da mesma forma, estudo analisando lactato no meio de cultura e no LB de embriões bovinos mostrou maior concentração de lactato no LB do que no meio (Gopichandran & Leese, 2003). Todos esses resultados que evidenciaram a presença de material genético e proteínas no LB, assim como o presente estudo, sugerem que o LB pode ser uma fonte potencial de marcadores bioquímicos para a qualidade embrionária.

Embora não tenha sido possível identificar a identidade molecular dos íons diferenciais, os resultados do presente estudo, mostram pela primeira vez, diferenças evidentes entre os perfis espectrométricos do LB de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*. Esses perfis fornecem um fenótipo que pode ser usado como ponto de partida para uma nova série de estudos usando visando utilizar o LB para fornecer informações sobre as características do embrião. Esses resultados, também abrem novas possibilidades de estudos, tais como associar diferentes técnicas de avaliação de embriões simultaneamente, como a presença de metabólitos, DNA livre de células e microRNAs tanto no meio de cultura quanto no LB. Além disso, forneceria informações importantes não só para indicar marcadores específicos de qualidade embrionária, mas também para propor mudanças nos sistemas de cultivo para produzir um embrião *in vitro* o mais semelhante possível ao *in vivo* e, assim, aumentar a eficiência da produção *in vitro* de embriões bovinos.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que o perfil metabólico do LB analisado por ESI-MS é capaz de identificar a origem do embrião. Além disso, os íons 453,1694 m/z ; 398,068 m/z e 437,1820 m/z podem ser identificados como biomarcadores de diferentes origens e que indiretamente pode estar relacionado a melhor qualidade do embrião.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barcroft, A. W. L. (2001). "Regulation of blastocyst formation." frontiers in Bioscience **6**: 22.
- Corcoran, D., T. Fair, S. Park, D. Rizos, O. V. Patel, G. W. Smith, P. M. Coussens, J. J. Ireland, M. P. Boland, A. C. O. Evans and P. Lonergan (2006). "Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in *in vitro* compared with *in vivo* cultured bovine embryos." Reproduction **131**(4): 651-660.
- D'Alessandro, A., G. Federica, S. Palini, C. Bulletti and L. Zolla (2012). "A mass spectrometry-based targeted metabolomics strategy of human blastocoele fluid: a promising tool in fertility research." Molecular BioSystems **8**(4): 953-958.
- Diaz, F., K. Bondioli, D. Paccamonti and G. T. Gentry (2016). "Cryopreservation of Day 8 equine embryos after blastocyst micromanipulation and vitrification." Theriogenology **85**(5): 894-903.
- Ealy, A. D., L. K. Wooldridge and S. R. McCoski (2019). "BOARD INVITED REVIEW: Post-transfer consequences of *in vitro*-produced embryos in cattle." Journal of Animal Science **97**(6): 2555-2568.
- Fair, T., P. Lonergan, A. Dinnyes, D. C. Cottell, P. Hyttel, F. A. Ward and M. P. Boland (2001). "Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocyst production." Molecular Reproduction and Development **58**(2): 186-195.
- Farra, C., F. Choucair and J. Awwad (2018). "Non-invasive pre-implantation genetic testing of human embryos: an emerging concept." Human Reproduction **33**(12): 2162-2167.
- Gianaroli, L., M. C. Magli, A. Pomante, A. M. Crivello, G. Cafueri, M. Valerio and A. P. Ferraretti (2014). "Blastocentesis: a source of DNA for preimplantation genetic testing. Results from a pilot study." Fertility and Sterility **102**(6): 1692-1699.e1696.
- Gopichandran, N. and H. Leese (2003). "Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid." Reproduction (Cambridge, England) **126**: 299-308.

- Hammond, E. R., A. N. Shelling and L. M. Cree (2016). "Nuclear and mitochondrial DNA in blastocoele fluid and embryo culture medium: evidence and potential clinical use." Human Reproduction **31**(8): 1653-1661.
- Lesse, J. L. (2012). "Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on." Reproduction **143**(4): 417-427.
- Holm, P., P. J. Booth, M. H. Schmidt, T. Greve and H. Callesen (1999). "High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using sofaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins." Theriogenology **52**(4): 683-700.
- Jensen, P. L., H. C. Beck, J. Petersen, J. Hreinsson, K. Wånggren, S. B. Laursen, P. D. Sørensen, S. T. Christensen and C. Y. Andersen (2012). "Proteomic Analysis of Human Blastocoele Fluid and Blastocyst Cells." Stem Cells and Development **22**(7): 1126-1135.
- Jensen, P. L., M. L. Grøndahl, H. C. Beck, J. Petersen, L. Stroebach, S. T. Christensen and C. Yding Andersen (2014). "Proteomic analysis of bovine blastocoele fluid and blastocyst cells." Systems Biology in Reproductive Medicine **60**(3): 127-135.
- Juliano, C. d. S., F. C. M. d. Á. Ana Clara, L. G. Hannah, E. B. Jason, A. W. Quinton and J. B. Gerrit (2018). "Cell-secreted vesicles containing microRNAs as regulators of gamete maturation." Journal of Endocrinology **236**(1): R15-R27.
- Kazemi, P., M. Dashtizad, M. Shamsara, F. Mahdavinezhad, E. Hashemi, S. Fayazi and H. Hajarian (2016). "Effect of blastocoele fluid reduction before vitrification on gene expression in mouse blastocysts." Molecular Reproduction and Development **83**(8): 735-742.
- Kuznetsov, V., S. Madjunkova, R. Antes, R. Abramov, G. Motamedi, Z. Ibarrientos and C. Librach (2018). "Evaluation of a novel non-invasive preimplantation genetic screening approach." PloS one **13**(5): e0197262-e0197262.
- Leaver, M. and D. Wells (2019). "Non-invasive preimplantation genetic testing (niPGT): the next revolution in reproductive genetics?" Human Reproduction Update **26**(1): 16-42.
- Li, P., Z. Song, Y. Yao, T. Huang, R. Mao, J. Huang, Y. Ma, X. Dong, W. Huang, J. Huang, T. Chen, T. Qu, L. Li, Y. Zhong and J. Gu (2018). "Preimplantation Genetic Screening with Spent Culture Medium/Blastocoele Fluid for *in vitro* Fertilization." Scientific Reports **8**(1): 9275.
- Machado, G. M., J. O. Carvalho, E. S. Filho, E. S. Caixeta, M. M. Franco, R. Rumpf and M. A. N. Dode (2009). "Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos." Theriogenology **71**(8): 1289-1297.
- Machado, G. M., A. R. Ferreira, I. Pivato, A. Fidelis, J. F. Spricigo, F. Paulini, C. M. Lucci, M. M. Franco and M. A. Dode (2013). "Post-hatching development of *in vitro* bovine embryos from day 7 to 14 *in vivo* versus *in vitro*." Molecular Reproduction and Development **80**(11): 936-947.
- Magli, M. C., C. Albanese, A. Crippa, C. Tabanelli, A. P. Ferraretti and L. Gianaroli (2019). "Deoxyribonucleic acid detection in blastocoele fluid: a new predictor of embryo ploidy and viable pregnancy." Fertility and Sterility **111**(1): 77-85.

- Magli, M. C., A. Pomante, G. Cafueri, M. Valerio, A. Crippa, A. P. Ferraretti and L. Gianaroli (2016). "Preimplantation genetic testing: polar bodies, blastomeres, trophectoderm cells, or blastocoelic fluid?" Fertility and Sterility **105**(3): 676-683.e675.
- Min, S. H., J. W. Kim, Y. H. Lee, S. Y. Park, P. S. Jeong, J. Y. Yeon, H. Park, K. T. Chang and D. B. Koo (2014). "Forced Collapse of the Blastocoel Cavity Improves Developmental Potential in Cryopreserved Bovine Blastocysts by Slow-Rate Freezing and Vitrification." Reproduction in Domestic Animals **49**(4): 684-692.
- Muñoz, M., A. Uyar, E. Correia, C. Díez, A. Fernandez-Gonzalez, J. N. Caamaño, D. Martínez-Bello, B. Trigo, P. Humblot, C. Ponsart, C. Guyader-Joly, S. Carrocera, D. Martin, B. Marquant Le Guenne, E. Seli and E. Gomez (2014). "Prediction of pregnancy viability in bovine *in vitro*-produced embryos and recipient plasma with Fourier transform infrared spectroscopy." Journal of Dairy Science **97**(9): 5497-5507.
- Noguchi, T., T. Aizawa, Y. Munakata and H. Iwata (2020). "Comparison of gene expression and mitochondria number between bovine blastocysts obtained *in vitro* and *in vivo*." The Journal of reproduction and development **66**(1): 35-39.
- Ochota, M., B. Wojtasik and W. Nizański (2017). "Survival rate after vitrification of various stages of cat embryos and blastocyst with and without artificially collapsed blastocoel cavity." Reproduction in Domestic Animals **52**(S2): 281-287.
- Palini, S., L. Galluzzi, S. De Stefani, M. Bianchi, D. Wells, M. Magnani and C. Bulletti (2013). "Genomic DNA in human blastocoel fluid." Reproductive BioMedicine Online **26**(6): 603-610.
- Parrish, J. J., A. Krogenaes and J. L. Susko-Parrish (1995). "Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development." Theriogenology **44**(6): 859-869.
- Peterson, A. J. and R. S. F. Lee (2003). "Improving successful pregnancies after embryo transfer." Theriogenology **59**(2): 687-697.
- Rizos, D., T. Fair, S. Papadopoulos, M. P. Boland and P. Lonergan (2002). "Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*." Molecular Reproduction and Development **62**(3): 320-327.
- Rule, K., R. J. Chosed, T. Arthur Chang, J. David Wininger and W. E. Roudebush (2018). "Relationship between blastocoel cell-free DNA and day-5 blastocyst morphology." Journal of Assisted Reproduction and Genetics **35**(8): 1497-1501.
- Seli, E., C. Robert and M.-A. Sirard (2010). "OMICS in assisted reproduction: possibilities and pitfalls." Molecular Human Reproduction **16**(8): 513-530.
- Sudano, M. J., V. G. Santos, A. Tata, C. R. Ferreira, D. M. Paschoal, R. Machado, J. Buratini, M. N. Eberlin and F. D. C. Landim-Alvarenga (2012). "Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* *In vitro*- and *In vivo*-Produced Blastocysts." Biology of Reproduction **87**(130, 1-11).

- Tedeschi, G., E. Albani, E. M. Borroni, V. Parini, A. M. Bruculeri, E. Maffioli, A. Negri, S. Nonnis, M. Maccarrone and P. E. Levi-Setti (2017). "Proteomic profile of maternal-aged blastocoel fluid suggests a novel role for ubiquitin system in blastocyst quality." Journal of Assisted Reproduction and Genetics **34**(2): 225-238.
- Tobler, K. J., Y. Zhao, R. Ross, A. T. Benner, X. Xu, L. Du, K. Broman, K. Thrift, P. R. Brezina and W. G. Kearns (2015). "Blastocoel fluid from differentiated blastocysts harbors embryonic genomic material capable of a whole-genome deoxyribonucleic acid amplification and comprehensive chromosome microarray analysis." Fertility and Sterility **104**(2): 418-425.
- Tšuiiko, O., D. I. Zhigalina, T. Jatsenko, N. A. Skryabin, O. R. Kanbekova, V. G. Artyukhova, A. V. Svetlakov, K. Teearu, A. Trošin, A. Salumets, A. Kurg and I. N. Lebedev (2018). "Karyotype of the blastocoel fluid demonstrates low concordance with both trophoctoderm and inner cell mass." Fertility and Sterility **109**(6): 1127-1134.e1121.
- Vajta, G. and M. Kuwayama (2006). "Improving cryopreservation systems." Theriogenology **65**(1): 236-244.
- Vera-Rodriguez, M., A. Diez-Juan, J. Jimenez-Almazan, S. Martinez, R. Navarro, V. Peinado, A. Mercader, M. Meseguer, D. Blesa, I. Moreno, D. Valbuena, C. Rubio and C. Simon (2018). "Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development." Human Reproduction **33**(4): 745-756.
- Viana, J. H. (2019). "2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals." Embryo Technology Newsletter **36**(4): 14.
- Zhang, Y., N. Li, L. Wang, H. Sun, M. Ma, H. Wang, X. Xu, W. Zhang, Y. Liu, D. S. Cram, B. Sun and Y. Yao (2016). "Molecular analysis of DNA in blastocoele fluid using next-generation sequencing." Journal of Assisted Reproduction and Genetics **33**(5): 637-645.

CAPÍTULO 5
CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotécnica bem estabelecida tanto em rebanhos de leite quanto de corte. Esta tecnologia de reprodução assistida tem sido utilizada principalmente para acelerar a multiplicação de animais melhoradores, conforme as características zootécnicas desejadas. Também, tem sido utilizada na preservação de animais.

Porém, produzir embriões de qualidade, com maior potencial de estabelecer e manter a gestação até o nascimento ainda é o grande desafio desta biotécnica. Sabe-se que mais da metade dos embriões transferidos falham à gestação, o que impacta negativamente a eficiência da PIV. Desta forma, as alternativas para reduzir essas perdas embrionárias se restringem a dois aspectos, melhorar a qualidade dos embriões e usar métodos de seleção que permitam escolher os melhores para serem transferidos. Neste estudo, o foco foi a busca de biomarcadores de qualidade embrionária que possam contribuir no desenvolvimento de um método capaz de selecionar para a transferência somente os melhores embriões. Para isso, duas abordagens foram realizadas, a primeira foi avaliar o meio de cultivo dos embriões que geraram ou não prenhez e a segunda foi analisar o líquido da blastocela dos embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*.

A primeira abordagem, comparou o perfil metabólico, obtido pela técnica de espectrometria de massa, e a concentração de compostos específicos como piruvato e lactato por fluorimetria, entre o meio de cultivo de embriões que geraram ou não gestação. Os resultados apesar de não terem indicado um marcador específico para a prenhez, mostraram diferenças entre os perfis metabólicos dos dois tipos de embriões. Este foi o primeiro trabalho que produziu os embriões totalmente *in vitro* e relacionou os metabólitos presentes no meio de cultivo com a prenhez.

Já na segunda abordagem em que o LB de embriões *in vivo* e *in vitro* foram comparados, o resultado mostrou perfis metabólicos totalmente distintos nos líquidos da blastocela dos dois tipos de embriões. Os resultados mostraram o potencial de uso do LB e, este trabalho, foi pioneiro em obter um perfil metabólico no LB caracterizando a qualidade dos embriões.

O conjunto das informações geradas neste estudo somado as crescentes publicações nesta área podem contribuir significativamente para o desenvolvimento de um sistema eficiente para selecionar os melhores embriões, seja no meio de cultivo ou no líquido da blastocèle, aumentando consideravelmente a eficiência da PIV.

Com os avanços conquistados nessa área, atualmente, em humanos, é possível sequenciar o DNA genômico utilizando o LB e/ou o meio de cultivo, sendo uma alternativa menos invasiva ao embrião quando comparada à biópsia. Portanto acredita-se que em breve a avaliação do meio de cultivo, do LB ou uma associação dos dois para presença de metabólitos, microRNAs, microvesículas, *cell free* DNA, irão constituir um painel de informações não só para a qualidade embrionária, mas também para a presença ou ausência de característica desejadas. Além disso, o uso dessas ferramentas associadas a outras, como por exemplo a criopreservação, trarão um ganho significativo às técnicas de reprodução assistida tanto em animais como em humanos.