

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

JOÃO FILIPI SCHEFFER PEREIRA

**DIPEPTÍDEOS ALANIL-GLUTAMINA E GLICIL-GLUTAMINA NA MATURAÇÃO DE
OÓCITOS E CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO***

*(Dipeptide alanyl-glutamine and glycyl-glutamine on maturation of oocytes and culture
of in vitro bovine embryos)*

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2015

JOÃO FILIPI SCHEFFER PEREIRA

**DIPEPTÍDEOS ALANIL-GLUTAMINA E GLICIL-GLUTAMINA NA MATURAÇÃO DE
OÓCITOS E CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO***

*(Dipeptide alanyl-glutamine and glycyl-glutamine on maturation of oocytes and culture
of in vitro bovine embryos)*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Profa. Dra. Cristina Santos Sotomaior

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2015

TERMO DE APROVAÇÃO
(Responsabilidade da Secretaria do PPGCA)

(Entregue pela secretaria)

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| AGRADECIMENTOS..... | vii |
| FORMATO DA DISSERTAÇÃO..... | ix |
| RESUMO GERAL..... | x |
| ABSTRACT..... | xii |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xiv |
| LISTA DE TABELAS..... | xv |
| LISTA DE QUADROS..... | xvi |
| CAPÍTULO 1 | |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| CAPÍTULO 2 | |
| 2 AMINOÁCIDOS E DIPEPTÍDEOS EM MEIOS DE MATURAÇÃO E CULTIVO NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES - REVISÃO DA LITERATURA | 5 |
| 2.1 AMINOÁCIDOS NOS MEIOS DE CULTIVO NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES..... | 7 |
| 2.1.1 Glutamina..... | 10 |
| 2.1.2 Alanina..... | 11 |
| 2.1.3 Glicina..... | 12 |
| 2.2 TOXICIDADE CAUSADA POR AMONÍACO ORIUNDO DE AMINOÁCIDOS NA PIVE..... | 13 |
| 2.3 DIPEPTÍDEOS ALANIL-GLUTAMINA E GLICIL-GLUTAMINA..... | 14 |
| 2.3.1 Importância na produção e qualidade de embriões..... | 15 |
| 2.3.2 Efeito dos dipeptídeos Alanil-glutamina e glicil-glutamina na MIV..... | 16 |
| 2.3.3 Efeito dos dipeptídeos Alanil-glutamina e glicil-glutamina na FIV..... | 17 |
| 2.3.4 Efeito dos dipeptídeos Alanil-glutamina e glicil-glutamina no CIV..... | 17 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.5 Utilização de dipeptídeos Alanil-glutamina e glicil-glutamina na produção <i>in vitro</i> de embriões..... | 18 |
|---|-----------|

CAPÍTULO 3

| | |
|--|-----------|
| 3 DIPEPTÍDEOS ALANIL-GLUTAMINA E GLICIL-GLUTAMINA NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS E CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS <i>IN VITRO</i> (Dipeptide alanyl-glutamine and glycyl-glutamine on maturation of oocytes and culture of <i>in vitro</i> bovine embryos)..... | 20 |
| Resumo..... | 20 |
| Abstract..... | 21 |
| 3.1 INTRODUÇÃO..... | 22 |
| 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 24 |
| 3.2.1 Recuperação de oócitos e maturação <i>in vitro</i> (MIV)..... | 24 |
| 3.2.2 Seleção espermática..... | 25 |
| 3.2.3 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)..... | 26 |
| 3.2.4 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)..... | 26 |
| 3.2.5 Delineamento Experimental..... | 27 |
| 3.2.6 Avaliação da cinética de desenvolvimento e produção de embriões <i>in vitro</i> | 28 |
| 3.2.7 Avaliação da qualidade dos embriões..... | 28 |
| 3.2.8 Análise estatística..... | 29 |
| 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 29 |
| 3.3.1 Taxa de clivagem | 29 |
| 3.3.2 Produção embrionária <i>in vitro</i> | 30 |
| 3.3.3 Qualidade embrionária | 36 |
| 3.4 CONCLUSÃO..... | 38 |
| CAPÍTULO 4 | |
| 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 39 |
| REFERÊNCIAS..... | 41 |
| ANEXO I – Classificação de oócitos..... | 51 |
| ANEXO II – Estágios embrionários | 52 |

In memoriam:
Euclides Felipe Scheffer
Andradina de Oliveira Scheffer

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

A Profa. Dra. Cristina Santos Sotomaior, por sua orientação, compreensão, ensinamentos e principalmente a concretização e dedicação constante na formação e no fortalecimento do Grupo de pesquisa em Produção *in vitro* de embriões (GPPIVE) – PUCPR.

Ao amigo MV. Maurício Barros Fernandes, por toda sua dedicação e colaboração para execução deste e de todos os trabalhos do GPPIVE, por sua amizade, paciência e esmero em suas contribuições na minha formação.

Aos alunos do GPPIVE: Jonathan de Jesus da Silva, Cátia de Paula Sant'Anna, Fernando Dijkstra, Bruna Cristina Heinzen, Norton Lee Bruel e Mayara Machado, pela amizade e por toda a dedicação e cuidados na realização de nossas atividades.

A Dra. Alexandra Cristina Senegaglia e a toda a equipe do Laboratório Experimental de Cultivo Celular – PUCPR, por todo apoio, colaboração e por nos acolher com imenso carinho.

As colegas Me. Letícia Fracaro e Me. Dhéri Maia, por sua amizade, disposição e colaboração.

Ao Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki e Prof. Me. Márcio Saporiski Segui, por suas contribuições e dedicação na minha formação e no fortalecimento do GPPIVE.

Ao Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss, pela confiança em nosso trabalho.

A Profa. Dra. Danielle Malheiros por aceitar o convite para compor a banca de avaliação deste trabalho.

As amigas MV. Crisley Morete e MV. Sandra Almeida pela amizade e companheirismo ao longo dessa trajetória realizada em conjunto, desejo-lhes muito sucesso!

A Evandro dos Santos Matozo, em especial, por sua imensa dedicação, compreensão, colaboração e carinho em todos os momentos.

A meus Pais e minha irmã Morgana pelo amor, apoio e compreensão nos momentos difíceis.

Aqueles que de alguma forma contribuíram nesse processo para minha formação humana, social, espiritual e profissional: Anna Asinelli, Daniel Carlos Rocha, Manoella Muller, Gisele Sechi, Profa. Dra. Thaís Rocha Coutinho Dittrich, Prof. Saulo Weber, Profa. Valéria Teixeira, Caroline Nocera, Francielly Peron, Ednorá Fatima Matozo, Telmo Tuon Albino e Samara Ramos.

As empresas Prófv Genética Animal, Frigorífico Argus, TK reprodução animal, CRI genética animal e CRV Lagoa, pelos materiais e Know How concedidos para a realização deste experimento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela oportunidade e oferta do curso.

A todos, o meu MUITO OBRIGADO!

João Filipi Scheffer Pereira

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral sobre o tema produção *in vitro* de embriões, os objetivos e a hipótese desta dissertação.

O capítulo 2 trata-se de revisão de literatura contextualizando o estado da arte da produção *in vitro* de embriões, a utilização de aminoácidos e o embasamento necessário explicando os benefícios e resultados encontrados com a utilização de dipeptídeos em meios de cultivo embrionário *in vitro* em substituição aos aminoácidos.

O capítulo 3 é referente ao artigo produzido a partir dos experimentos realizados, avaliando a utilização de dipeptídeos na maturação *in vitro* de oócitos e no cultivo *in vitro* de embriões bovinos. A publicação dos dados é dependente do registro de patente. Quando publicados, a submissão será para a revista *Theriogenology*, classificada como Qualis A2 para a área de Medicina Veterinária.

O Capítulo 4 finaliza esta dissertação com conclusões gerais deste trabalho e com sugestões e hipóteses para continuidade dos estudos relacionados com esta dissertação em projetos futuros.

As referências de todos os capítulos se encontram em lista única ao final da dissertação.

RESUMO GERAL

A produção de embriões bovinos *in vitro* apresentou grande avanço nos últimos anos no Brasil, tornando o país líder mundial. Aminoácidos fazem parte da lista de componentes dos meios de maturação e cultivo *in vitro*, com benefícios fundamentais à cultura de embriões bovinos como o aumento das taxas de maturação, clivagem, blastocistos e eclosão embrionária, além da melhoria da qualidade dos embriões com aumento da contagem total de células. No entanto, a glutamina apresenta alguns prejuízos, por ser espontaneamente degradada em soluções aquosas e temperaturas superiores a 37°C, gerando compostos amoníacos tóxicos aos embriões. Dipeptídeos são estruturas químicas compostas por dois aminoácidos conjugados, estáveis a altas temperaturas. Alanil-glutamina e Glicil-glutamina são dipeptídeos sugeridos para substituição da glutamina nos meios de maturação e cultivo *in vitro* de embriões. O objetivo desta pesquisa é estudar os efeitos dos compostos estáveis alanil-glutamina (Ala-gln) e glicil-glutamina (Gli-gln) em substituição aos aminoácidos glutamina, alanina e/ou glicina na maturação *in vitro* (MIV) de oócitos e no cultivo *in vitro* (CIV) de embriões bovinos, com a finalidade de se determinar os efeitos sobre a produção e qualidade dos embriões produzidos *in vitro*. A avaliação dos embriões foi realizada por meio da cinética de desenvolvimento *in vitro* nos dias 3 (d3), 7 (d7) e 8 (d8) de CIV e da qualidade embrionária, pela contagem total de células. O experimento 1 avaliou Ala-gln em substituição à glutamina na MIV. O experimento 2 avaliou Gli-gln em substituição à glutamina na MIV. Os experimentos 3 e 4 avaliaram duas diferentes concentrações de Ala-gln e Gli-gln associados na substituição da glutamina, alanina e glicina no CIV. No experimento 5, foram preparados dois grupos tratados, sendo Ala-gln adicionado de glicina e Gli-gln adicionado de alanina substituindo glutamina e alanina ou glicina. Não houve diferença ($p>0,05$) na taxa de clivagem entre os grupos tratados e controle independente da etapa de aplicação (MIV ou CIV) dos dipeptídeos. Ala-gln, quando utilizado na MIV, aumentou ($p<0,05$) a taxa de blastocistos (d7) e o total de embriões em d7 e d8, Gli-gln não diferiu ($p>0,05$) nos parâmetros avaliados em relação ao controle. No CIV, quando Ala-gln e Gli-gln foram utilizados associados em maior concentração, houve uma redução ($p<0,05$) na taxa de blastocistos expandidos, total

de embriões (d7) e eclosão embrionária (d8). Quando os dipeptídeos foram adicionados separadamente, com a adição do aminoácido alanina e/ou glicina de acordo com o dipeptídeo, observou-se redução do total de embriões em d7 e d8 ($p < 0,05$) para ambos os grupos tratados em relação ao controle, e da eclosão embrionária para Gli-gln adicionado de alanina em relação ao Ala-gln adicionado de glicina e controle. Houve redução na contagem total de células quando os dipeptídeos foram aplicados associados no CIV, mas não quando os dipeptídeos foram utilizados separados nas etapas de MIV e CIV. Conclui-se que Ala-gln pode ser utilizado como substituto da glutamina em meios MIV, aumentando a produção embrionária, sem interferir na qualidade embrionária, mas não se recomenda a utilização dos dipeptídeos em conjunto ou isolados na etapa de CIV.

Palavras-chave: alanil-glutamina, glicil-glutamina, oócitos, embriões *in vitro*.

ABSTRACT

The *in vitro* production of bovine embryos showed great progress in recent years in Brazil, making the country a world leader. Amino acids are part of the list of components in the maturation and *in vitro* culture, with key benefits to the culture of bovine embryos as increased maturation rates, cleavage, blastocyst and embryo hatching, in addition to improving the quality of embryos with increased total cells count. However, glutamine has some damage, because it spontaneously degrades in aqueous solutions and temperatures exceeding 37°C, generating ammonia compounds that are toxic to embryos. Dipeptides are stable compounds at high temperatures. Alanyl-glutamine and glycyl-glutamine dipeptides are suggested for substitution of glutamine in *in vitro* culture and maturation media. The objective of this research is to study the effects of stable compounds alanyl-glutamine (Ala-gln) and glycyl-glutamine (Gli-gln) to replace the amino acid glutamine, alanine and/or glycine in *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes and *in vitro* culture (IVC) of bovine embryos in order to determine the effects on the yield and quality of bovine embryos produced *in vitro*. The evaluation was performed by *in vitro* development kinetics on days 3 (d3), 7 (d7) and 8 (d8) of IVC and embryo quality by total cells count. In the experiment 1, it was evaluated Ala-gln replacing glutamine in IVM. The experiment 2, it was evaluated Gli-gln replacing glutamine in IVM. The experiments 3 e 4 evaluated two different concentrations of dipeptides Ala-gln and Gly-gln in replacement of glutamine, alanine and glycine. In the experiment 5 were prepared two treated groups, Ala-gln added with glycine and the Gly-gln added with alanine. There was no difference ($p > 0.05$) in cleavage rate between treated groups and control groups, no matter the implementation phase (IVM or IVC) of the dipeptide. Ala-gln when used in IVM increased ($p < 0.05$) the blastocyst rate (d7) and the total number of embryos ind 7 and d8. Gli-gln showed no differences in all parameters evaluated. In IVC, when Ala-Gln and Gly-Gln were used in combination, there was a reduction ($p < 0.05$) in the expanded blastocyst rate, total number of embryos (d7) and of embryo hatching (D8). When dipeptides were added separately, with the addition of alanine and/or glycine dipeptide, according to the amino acid, there was a reduction ($p < 0.05$) in

the total number of embryos (d7 and d8) and in embryo hatching (d8) when the Gly-Gln was used with addition of alanine. There was a reduction in total cell count when dipeptides were used together in IVC, but not when they were used alone in IVM and IVC. We conclude that Ala-Gln can be used as a substitute for glutamine in IVM media, increasing embryo production, without interfering with embryo quality, but it is not recommended the use of dipeptides together or isolated in IVC.

Keywords: Alanyl-glutamine. Glycyl-glutamine. Oocytes. *In vitro* embryos.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------|--|
| PIVE | Produção <i>in vitro</i> de embriões |
| FSH | Hormônio Folículo Estimulante (Follicle-Stimulating Hormone) |
| GH | Hormônio do Crescimento (Growth Hormone) |
| LH | Hormônio Luteinizante (Luteinizing Hormone) |
| MIV | Maturação <i>in vitro</i> (<i>in vitro</i> maturation) |
| FIV | Fertilização <i>in vitro</i> (<i>in vitro</i> fertilization) |
| CIV | Cultivo <i>in vitro</i> (<i>in vitro</i> culture) |
| BSA | Albumina sérica bovina (Bovine serum albumin) |
| SFB | Soro fetal bovino (Fetal bovine serum) |
| Ala-gln | Alanil-glutamina (Alanyl-glutamine) |
| Gli-gln | Glicil-glutamina (Glycyl-glutamine) |
| IA | Inseminação artificial (Artificial insemination) |
| IATF | Inseminação artificial em tempo fixo (Artificial insemination fixed time) |
| MOET | Múltipla ovulação e transferência de embriões (Multiple ovulation and embryo transfer) |
| MII | Metáfase II (Metaphase II) |
| EAA | Aminoácidos essenciais (Essential amino acids) |
| NEA | Aminoácidos não essenciais (Nonessential amino acids) |
| BME | <i>Basal Medium Eagle</i> |
| MEM | <i>Minimum Essential Medium</i> |
| PVC | Álcool polivinílico (Polyvinyl alcohol) |
| pH | Potencial de hidrogênio (Potential of hydrogen) |
| ICM | Massa celular interna (Inner mass cell) |
| TE | Trofoblasto (Trophoblast) |
| d3 | Dia 3 (Day 3) |
| d7 | Dia 7 (Day 7) |
| d8 | Dia 8 (Day 8) |
| COC | Complexo cumulus oócito (Cumulus oocyte complex) |
| ZP | Zona pelúcida |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|---|---------------|
| Tabela 1. Porcentagem (%) média e desvio padrão da taxa de clivagem, no dia 3 (d3) de cultivo <i>in vitro</i> | 30 |
| Tabela 2. Porcentagem (%) média e desvio padrão para produção embrionária no dia 7 (d7) de cultivo <i>in vitro</i> , nos estágios de blastocistos, blastocistos expandidos, blastocistos eclodidos e total de embriões bovinos utilizando dipeptídeos na MIV..... | 31 |
| Tabela 3. Porcentagem (%) média e desvio padrão para eclosão embrionária e total de embriões no dia 8 (d8) de cultivo <i>in vitro</i> utilizando dipeptídeos na MIV..... | 32 |
| Tabela 4. Porcentagem (%) média e desvio padrão para produção embrionária no dia 7 (d7) de cultivo <i>in vitro</i> , nos estágios de blastocistos, blastocistos expandidos, blastocistos eclodidos e total de embriões bovinos utilizando dipeptídeos no CIV..... | 34 |
| Tabela 5. Porcentagem (%) média e desvio padrão para eclosão embrionária e total de embriões no dia 8 (d8) de cultivo <i>in vitro</i> utilizando dipeptídeos no CIV..... | 35 |
| Tabela 6. Média e desvio padrão para contagem total de células de embriões eclodidos no dia 8 (d8) de cultivo <i>in vitro</i> | 37 |

LISTA DE QUADROS

| | Página |
|---|---------------|
| Quadro1. Grupos de aminoácidos essenciais e não essenciais..... | 8 |

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Bioteχνologias reprodutivas são ferramentas utilizadas no melhoramento genético de animais de produção. Entre estas bioteχνologias está a produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos que fundamentalmente é utilizada em dois processos: a multiplicação de material genético e a aceleração do melhoramento genético.

Com a multiplicação de material genético, pode-se destacar o cruzamento industrial entre raças, com o propósito de se aproveitar a heterose das raças na produção de animais para produção e qualidade de carne ou leite (Pontes et al., 2010). Outro ponto importante é a otimização do material genético materno e paterno de indivíduos puros de origem ou com genética de interesse comercial no melhoramento de rebanhos, obtendo-se pela PIVE um grande número de bezerros oriundos do mesmo acasalamento.

A PIVE é a bioteχνologia que permite obter o maior número de progênies/ano (entre 25 e 50 bezerros) de uma mesma doadora (Varago et al., 2008) e um grande número de embriões utilizando uma única palheta de sêmen criopreservado.

Na aceleração do melhoramento genético, a PIVE permite que um produtor obtenha em apenas uma geração um rebanho de alto padrão racial ou puro de origem, com a compra de gametas de animais puros de origem. O maior número de progênie também permite uma maior pressão de seleção e redução do intervalo entre gerações, utilizando fêmeas de alto potencial produtivo e racial como doadoras de oócitos para a produção dos embriões e fêmeas de baixo potencial ou sem padrão racial como receptoras de embriões produzidos *in vitro* (Marinho et al., 2012).

A maior vantagem da PIVE é a flexibilidade para ser utilizada em rebanhos de qualquer aptidão e tamanho, tenha como finalidade a produção de animais comerciais destinados ao abate ou produção de leite, ou ainda produção de animais de elite, reprodutores e matrizes.

Atualmente o Brasil é líder mundial na produção de embriões *in vitro*, com mais de 340 mil embriões bovinos produzidos *in vitro* em 2012 e representa mais de 75% da produção mundial de embriões *in vitro*, segundo o boletim estatístico da Sociedade

Internacional de Transferência de Embriões (IETS, 2013). O boletim também mostra dados com pouco mais de 50 mil embriões produzidos *in vivo*, que evidenciam o maior interesse na biotécnica PIVE no Brasil, principalmente se comparado aos Estados Unidos, onde mais de 250 mil embriões *in vivo* em contrapartida dos 74 mil embriões *in vitro* produzidos em 2012.

A liderança só foi possível pelo desenvolvimento tecnológico consistente e pelos avanços científicos ocorridos desde a década de 90, quando se iniciaram as pesquisas com PIVE no Brasil.

De modo geral, podem-se citar como alguns dos principais avanços tecnológicos a utilização da ultrassonografia nos processos de punção folicular guiada por ultrassonografia (OPU) em animais vivos e a compreensão da dinâmica folicular, caracterizando a fisiologia ovariana e o ciclo estral, bem como, determinando as fases para obtenção do maior número de oócitos e, conseqüentemente, reduzindo o intervalo entre gerações (Viana e Bols, 2005; Varago et al., 2008; Binelli et al., 2009). Após a realização da OPU e conseqüente obtenção dos oócitos, a PIVE consiste de três etapas em laboratório: Maturação *in vitro* (MIV), Fertilização *in vitro* (FIV), Cultivo *in vitro* (CIV) (Gonçalves et al., 2007; Varago et al., 2008).

Os efeitos farmacológicos das prostaglandinas, progestágenos e gonadotrofinas (hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH)), assim como seus análogos, na sincronização do ciclo estral também têm sido constantemente avaliados, com a finalidade de se otimizar a produção de embriões. A sincronização do ciclo estral tem sido muito bem aplicada no preparo de receptoras de embriões produzidos *in vitro* (Spell et al., 2001; Bó et al., 2002). No entanto, segundo Martins (2014), existe uma dificuldade de padronização de protocolos em doadoras que reflitam em uma maior produção embrionária.

A compreensão da MIV dos oócitos, capacitação espermática, FIV e as necessidades nutricionais dos gametas e embriões, bem como dos sistemas de cultivo (Gonçalves et al., 2007), estão entre os avanços científicos que levaram a uma produção em escala comercial de embriões *in vitro*. A produção comercial ganhou destaque com a utilização de sêmen criopreservado e sexado (Pontes et al., 2010).

Esses avanços não ocorreram de maneira simultânea, mas permitiram ao Brasil chegar ao patamar de líder mundial na PIVE pelo terceiro ano consecutivo (IETS, 2013).

Entender as necessidades nutricionais dos gametas e embriões e a interação dos meios de cultivo com o sistema de cultivo contribuiu para determinar os efeitos *in vitro* da adição de aminoácidos, sais e proteínas (soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA)) nos meios de cultivo.

Uma importante contribuição foi a relação entre o sistema de cultivo *in vitro* com as características observadas, inerentes e relacionados à doadora, ao reprodutor, raça, idade, patologias neonatais do bezerro PIVE e as influências da qualidade de oócitos e embriões sobre os índices de produção da PIVE (Leeuw et al., 1998).

O ponto crucial da PIVE está relacionado à baixa qualidade de oócitos e embriões, que impedem melhores taxas de produção embrionária e gestação (Lonergan et al., 1994; Enright et al., 2000).

A utilização eficiente da criopreservação como biotecnologia de suporte para conservação do material genético e o aumento das taxas de produção embrionária na PIVE depende da melhoria da qualidade de oócitos e embriões produzidos *in vitro*.

Os meios e os sistemas de cultivo são o principal alvo de estudos para melhorar a qualidade embrionária, que ao longo dos anos apresentaram resultados importantes com os ajustes da regulação e tipos de fontes energéticas relacionadas a: a) cada fase embrionária (Takahashi e First, 1992), b) adição e os efeitos de aminoácidos (Rosenkrans e First, 1994; Steeves e Gardner, 1999), c) regulação e redução das concentrações do SFB (Nakao e Nakatsuji, 1990; Wang et al., 1997), d) interação e regulação do pH e osmolaridade dos meios de cultivo com o ambiente de CIV e redução das concentrações de oxigênio na atmosfera de CIV (Gardner e Lane, 1996) e, ainda, e) o co-cultivo de células (Goto et al., 1988; Zhang et al., 1995; Donnay et al., 1997).

Mesmo com importantes estudos esclarecendo diversos fatores importantes ao desenvolvimento embrionário, o ambiente de CIV apresenta características de toxicidade para o desenvolvimento de embriões *in vitro*, principalmente relacionado à adição do aminoácido glutamina (Gardner e Lane, 1993).

Importante ao metabolismo e ao desenvolvimento embrionário, a glutamina não pode ser reduzida ou retirada dos meios de cultivo (Carney e Bavister, 1987; Christie e Butler, 1994). Porém, devido a sua degradação espontânea em soluções aquosas, como o meio de cultivo *in vitro* de embriões, ocorre o acúmulo de compostos amoníacos no meio de cultivo que são tóxicos ao desenvolvimento embrionário *in vitro* (Roth et al., 1988; Gardner e Lane, 1993; Hashimoto et al., 2008).

Na busca por uma estabilidade do ambiente *in vitro* e redução da toxicidade, surgiram pesquisas com a utilização dos dipeptídeos alanil-glutamina (Ala-gln) e glicil-glutamina (Gly-gln) que tiveram seus efeitos estudados na produção de embriões *in vitro* de diversas espécies como ratos, suínos e humanos (Summers et al., 2005; Tareq et al., 2007; Tareq et al., 2008; Stevanato, 2009; Moraveck et al., 2012; Kim et al., 2013; Tareq et al., 2013). Em ruminantes, não foram encontrados relatos que tinham como objetivo da pesquisa avaliar os efeitos dos dipeptídeos.

Com dipeptídeos substituindo os aminoácidos glutamina, alanina e/ou glicina, foi possível reduzir os níveis de compostos amoníacos dos meios de cultivo *in vitro* (Tareq et al., 2007), sendo que o aumento na contagem de células embrionárias foi o principal parâmetro observado e corresponde a uma melhora na qualidade de embriões de ratos (Summers et al., 2005). Os dipeptídeos também foram associados a melhores taxas de gestação em humanos (Stevanato, 2009).

O objetivo desta pesquisa é estudar os efeitos dos compostos estáveis alanil-glutamina e glicil-glutamina em substituição aos aminoácidos glutamina, alanina e/ou glicina na maturação *in vitro* de oócitos bovinos e no cultivo *in vitro* de embriões bovinos, com a finalidade de se determinar os efeitos sobre a produção e qualidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro*.

A hipótese desta pesquisa é que a utilização de compostos estáveis como a alanil-glutamina e glicil-glutamina, em substituição aos aminoácidos glutamina, alanina e/ou glicina, promove um incremento na produção e qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*, por causar redução da toxicidade do ambiente *in vitro* conhecida pela produção de amoníaco oriundo da instabilidade da glutamina nos meios de cultivo *in vitro*.

CAPÍTULO 2

2 AMINOÁCIDOS E DIPEPTÍDEOS EM MEIOS DE MATURAÇÃO E CULTIVO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES – REVISÃO DE LITERATURA

Biotécnicas da reprodução têm sido utilizadas com a finalidade de acelerar o melhoramento genético. No Brasil, observa-se que em aproximadamente 10% do rebanho de fêmeas se utiliza a inseminação artificial (IA) ou inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Em 2013, a comercialização de doses de sêmen atingiu valores recordes, com 13 milhões de doses comercializadas, e um crescimento de 5,54% em relação a 2012 (ASBIA, 2013).

Desde 2002, observou-se um exponencial crescimento da aplicação da produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos, tornando o Brasil maior produtor mundial de embriões bovinos *in vitro*, ultrapassando a margem de 340 mil embriões (IETS, 2013). Em contrapartida, vem se observando uma redução na utilização da técnica de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOET) obtidos *in vivo*, principalmente por conta dos custos envolvidos na aplicação da biotecnologia em comparação à PIVE.

A busca pela aceleração do melhoramento genético está relacionada ao interesse no melhor aproveitamento das áreas de produção de pecuária e a intensificação de ganhos por unidade de produção, principalmente pela posição do país no mercado mundial de produção de carne e leite.

A produção *in vitro* de embriões bovinos ganhou destaque com a mudança nos paradigmas da sua utilização, principalmente com o aproveitamento de biotecnologia para a multiplicação de material genético e a aceleração do melhoramento, permitindo aplicar a PIVE em rebanhos comerciais sem a necessidade de aquisição de doadoras de alto potencial genético e pelo melhor aproveitamento da dose de sêmen, induzindo a aquisição de sêmen de reprodutores de alto potencial genético e com valores mais altos por dose.

Essa mudança de paradigmas só foi possível com a redução dos custos do processo e o aumento da eficiência na produção dos embriões, com a melhoria nas taxas de produção e qualidade embrionária. Ainda hoje, observa-se um grande

potencial para melhoria do processo, uma vez que as taxas de produção embrionária e as taxas de prenhez de embriões *in vitro* variam de zero até 50% (Gonçalves et al., 2007; Varago et al., 2008). Incrementos nos resultados do processo PIVE permitiram a definitiva utilização desta técnica em larga escala para a produção de animais comerciais.

A PIVE consiste de três etapas: Maturação *in vitro* (MIV), período de cultivo do oócito até o estágio de metáfase II da meiose II; Fertilização *in vitro* (FIV), período de cultivo com a união de espermatozoides e oócitos maturados; Cultivo *in vitro* (CIV), que consiste no período de cultivo para o desenvolvimento embrionário dos possíveis zigotos até o estágio de blastocisto, no qual são transferidos para receptoras bovinas (Varago et al., 2008).

Um grande marco histórico da PIVE, que permitiu atingir o potencial de produção embrionária atual, foi a adição de aminoácidos nos meios de cultivo utilizados na produção *in vitro* de embriões (Rosenkrans e First, 1994; Steeves e Gardner, 1999). Entretanto, fatores negativos e positivos foram observados com a presença dos aminoácidos em meios de cultivo da PIVE, principalmente relacionado à toxicidade oriunda de amoníacos livres no meio de cultivo *in vitro* (Gardner e Lane, 1993).

Em modelos animais, as pesquisas demonstram que o estresse celular e o resultado da adaptação às condições do cultivo *in vitro* durante os estágios de pre-implantação, pode afetar as taxas de prenhez e do crescimento fetal. Portanto, é importante entender o papel dos componentes do meio e identificar possíveis fontes de estresse celular embrionário que afetam a função e viabilidade fetal (Lane and Gardner, 2007).

A metabolômica tem finalidade de estudar metabólitos e a presença de compostos no meio de cultura que tenham capacidade de refletir um quadro fisiológico do embrião (Stevanato, 2009); por exemplo, através da análise de consumo e produção de aminoácidos e outros compostos (Leese et al., 1993). Os aminoácidos foram relacionados com a produção de compostos amoníacos em meios de cultivo, principalmente a glutamina (Roth et al., 1988). Para resolver os efeitos deletérios dos amoníacos e a toxicidade destes compostos para embriões *in vitro*, iniciou-se a utilização de dipeptídeos.

O objetivo desta revisão bibliográfica é compreender o estado da arte de aminoácidos e dipeptídeos e sua aplicação em meios de cultivo *in vitro*, efeitos benéficos e prejudiciais na PIVE, a função e o metabolismo no desenvolvimento embrionário, com o propósito de estabelecer parâmetros que justifiquem a substituição de aminoácidos por dipeptídeos em meios de cultivo para a produção *in vitro* de embriões.

2.1 AMINOÁCIDOS NOS MEIOS DE CULTIVO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Meios de cultivo embrionário são compostos por fontes energéticas, proteicas, aminoácidos, vitaminas e sais (Leese et al., 1993; Lane e Gardner, 2007), com função de atender à necessidade básica e nutrir ou de prover a regulação e o metabolismo celular. Em particular, os aminoácidos têm funções específicas e estão envolvidos na síntese de proteínas e metabolismo energético (reguladores e substratos), atuando também na regulação osmótica e do pH (Lane e Gardner, 2007).

Os aminoácidos são compostos orgânicos e consistem em um carbono α central com quatro ligações. Três das ligações do carbono α são comuns a todos os aminoácidos, sendo a ligação com um átomo de hidrogênio (H), um grupo carboxila (COOH) e um grupo amina (H₂N). A quarta ligação, ou cadeia lateral R, pode variar desde um átomo de hidrogênio a anéis aromáticos (Nelson e Cox, 2011).

Os aminoácidos podem ser classificados em essenciais (EAA) e os não essenciais (NEA) (Quadro 1). EAA são aqueles que o organismo não consegue sintetizar e, portanto, devem ser obtidos através da ingestão de alimentos; NEA, os que o organismo consegue sintetizar, atendendo a necessidade metabólica (Nelson e Cox, 2011).

Quadro 1: Grupos de aminoácidos essenciais e não essenciais.

| | |
|----------------------------|---|
| Aminoácidos Essenciais | Valina, Treonina, Triptofano, Metionina, Fenilalanina, Lisina, Isoleucina e Leucina. |
| Aminoácidos não essenciais | Alanina, Asparagina, Ácido aspártico, Cisteína, Ácido glutâmico, Glutamina, Glicina, Prolina, Serina, Tirosina, Histidina e Arginina. |

Fonte: Nelson e Cox (2011).

A reserva proteica do oócito ou turnover proteico intracelular permite aos embriões desenvolverem-se sem a presença de aminoácidos em meios de cultivo; no entanto, podem ocorrer alterações no desenvolvimento. O turnover foi sugerido como uma ferramenta de predileção para mensurar a capacidade de desenvolvimento embrionário humano (Houghton et al., 2002), porém os benefícios para o desenvolvimento embrionário com a presença de aminoácidos nos meios de cultivo sugerem sua aplicação.

Os efeitos dos aminoácidos, estimulatórios e inibitórios, sobre o desenvolvimento embrionário foram inicialmente identificados em outras espécies como o hamster (Carney e Bavister, 1987).

Os embriões apresentam necessidades específicas para o consumo de aminoácidos (Partridge e Leese, 1996; Lane e Gardner, 1997a) e fontes energéticas (Takahashi e First, 1992), de acordo com a fase de desenvolvimento *in vitro* de zigoto até o estágio de blastocisto.

A chave do desenvolvimento embrionário *in vitro* está relacionada ao período de transição do genoma embrionário (transição materno zigótica), que ocorre gradualmente até o estágio de oito células clivadas em bovinos. Este período caracteriza-se pelo uso de reservas maternas oriundas do oócito antes da transição e a necessidade da ativação metabólica, com a expressão dos genes influenciados por diversos fatores após a ativação do genoma embrionário (Van Der Valk et al., 2010; Cagnone et al., 2012).

Esse processo é de fundamental importância quando se estudam os efeitos de substâncias como os aminoácidos sobre o desenvolvimento embrionário. Evidências

mostram o piruvato como fonte de energia nas fases iniciais (antes da transição materno zigótica), a glicose (após a transição materno zigótica), e glicose e glutamina na manutenção e formação da blastocela e expansão dos blastocistos bovinos (Leese e Barton, 1984; Rieger et al., 1992b).

A concentração dos aminoácidos no meio de cultivo *in vitro* e a espécie animal foram considerados os fatores limitantes para se estudar os efeitos sobre o desenvolvimento embrionário (Carney e Bavister, 1987). A concentração de aminoácidos, devido ao efeito sobre o desenvolvimento embrionário, onde relatos descrevem que alguns aminoácidos estimulavam e outros inibiam o desenvolvimento dos embriões (Carney e Bavister, 1987; Gardner e Lane, 1993). E a espécie animal, pelas diferenças encontradas entre as espécies quanto à necessidade da adição de aminoácidos essenciais e não essenciais específicos (Steeves e Gardner, 1999), principalmente devidos aos diferentes efeitos de um mesmo aminoácido em diferentes espécies (Lee e Fukui, 1996).

Outro fator considerado nos estudos é o estágio de desenvolvimento, refletindo em tipos específicos de aminoácidos a serem produzidos e consumidos pelos embriões (Rieger et al., 1992a; Booth et al., 2005).

Em meios de cultivo embrionário, os aminoácidos são comumente adicionados na forma de solução concentrada, como o *Basal Medium Eagle* (BME), composto por EAA e vitaminas do complexo B; e os NEA são encontrados no *Minimum Essential Medium* (MEM).

A adição de EAA e NEA nos meios de cultivo de embriões mostrou um incremento na produção de blastocistos em bovinos (Tiffin et al., 1991, Rosenkrans e First, 1994; Steeves e Gardner, 1999), hamsters (Carney e Bavister, 1987), suínos (Meyen et al., 1989; Humpherson et al., 2005), ratos e camundongos (Lane e Gardner, 1998; Biggers et al., 2000) e humanos (Devreker et al., 2001). Não foram encontrados relatos para ovinos e caprinos.

Na fase inicial de desenvolvimento, os EAA tenderam a anular os efeitos benéficos dos NEA, conseqüentemente reduzindo o número de células do blastocisto e a viabilidade pós implantação (Lane e Gardner, 1997a).

De acordo com Lane e Gardner (1997b), os NEA em meios de cultivo de embriões de ratos reduziram o tempo das primeiras clivagens e aumentaram a proporção de embriões de oito células em comparação com o meio sem aminoácidos. Entre a fase de oito células até blastocistos, os NEA incrementaram as taxas de blastocistos e eclosão e os EAA aumentaram a contagem de células embrionárias (Lane e Gardner, 1997a). Posteriormente, as informações foram validadas para embriões bovinos (Steeves e Gardner, 1999).

As diferenças encontradas na ação dos EAA e NEA entre as espécies estão relacionadas às enzimas metabólicas próprias da espécie embrionária (Rosenkrans e First, 1994). Em embriões bovinos, o incremento na produção foi de aproximadamente 10% com uso de EAA e 8% de NEA (Rosenkrans e First, 1994).

Em resumo, entre os efeitos benéficos da adição de aminoácidos EAA e NEA em meios de cultivo de embriões bovinos, está a redução do bloqueio embrionário no estágio de oito células, incremento da taxa de blastocistos e o aumento da contagem de células total, da massa celular interna (ICM) e do trofoblasto (TE) (Tiffin et al., 1991; Steeves e Gardner, 1999).

Os aminoácidos participam de diversos processos relacionados ao metabolismo embrionário. Glutamina, alanina e glicina apresentam funções principais no desenvolvimento embrionário, sendo os aminoácidos de maior concentração nos meios de cultivo PIVE e de consumo e síntese pelos embriões.

2.1.1 Glutamina

A glutamina é um aminoácido não essencial, cuja cadeia lateral R tem característica hidrofílica, dissolvendo-se facilmente em água. É o aminoácido de maior concentração nas células (Nelson e Cox, 2011).

O consumo da glutamina ocorre quando é convertida a glutamato e/ou α -cetoglutarato para ser utilizada no ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs) gerando ATP, utilizada como fonte de energia no metabolismo celular (Chatot et al., 1990).

Os primeiro relatos (Carney e Bavister, 1987; Chatot et al., 1989) evidenciaram a glutamina como um aminoácido de grande importância para o desenvolvimento embrionário de hamster e rato. Estudos em embriões de diversas espécies como

humanos (Devreker et al., 1998), suínos (Petters et al., 1990; Swain et al., 2002; Booth et al., 2005), bovinos (Tiffin et al., 1991, Rieger et al., 1992b) e ratos (Chatot et al., 1990) evidenciam aumento na formação de blastocistos na presença de glutamina.

No estudo de Carney e Bavister (1987), a presença da glutamina aumentou significativamente a produção de blastocistos em comparação ao grupo controle sem aminoácidos. Glutamina na concentração de 1 mM obteve acentuada produção de blastocisto e permitiu suportar o desenvolvimento embrionário reduzindo o número de embriões com bloqueio embrionário no estágio de oito células, diferentemente da concentração de 0,1mM, onde a produção de blastocistos foi significativamente reduzida.

Embriões bovinos mostraram intenso consumo de glutamina nos estágios finais de desenvolvimento (blastocistos), diferentemente do que foi observado nos estágios iniciais (Rieger et al., 1992a; Li et al., 2006).

Efeito sinérgico com a utilização de NEA associado à glutamina foi observado estimulando o desenvolvimento embrionário nos estágios iniciais, auxiliando na redução do bloqueio embrionário e aumento da produção de blastocistos de ratos e bovinos. No caso de NEA na ausência de glutamina, houve redução significativa na contagem total de células dos blastocistos (Tiffin et al., 1991, Gardner e Lane, 1993; Gardner e Lane, 1996; Steeves e Gardner, 1999). Steeves e Gardner (1999) mostram que o cultivo de embriões bovinos com os 20 aminoácidos principais aumentou o número total de células embrionárias e a diferenciação celular trofoblasto (TE) e massa celular interna (ICM).

O mecanismo de atuação da glutamina não está totalmente elucidado, mas evidências mostram sua participação no ciclo de Krebs e no metabolismo da glicose (Chatot et al., 1990; Tiffin et al., 1991), na osmorregulação (Steeves e Gardner, 1999), na redução da peroxidação lipídica (Rieger, 1992), bem como, na síntese de purinas e pirimidinas (Leese et al., 1993).

2.1.2 Alanina

A alanina pertence ao grupo dos NEA e tem como característica principal uma cadeia lateral hidrofóbica, conferida por sua estrutura simples, que deriva da

transferência de um grupo amina para o piruvato quando em sua síntese (Nelson e Cox, 2011).

Alguns autores sugerem que a síntese constante de alanina, intensificada na fase de compactação e formação da blastocle de embriões bovinos, tem como função o carregamento de amoníaco para o espaço extracelular (Lee e Fukui, 1996; Partridge e Leese, 1996; Orsi e Leese, 2004; Humpherson et al., 2005). Além disso, é uma evidência da ausência do ciclo de uréia em embriões, sendo este um mecanismo materno, com a absorção de íons amoníaco pelo endométrio uterino.

A associação de alanina e glicina nos meios de CIV apresentou sinergismo, melhorando o desenvolvimento embrionário bovino (Lee e Fukui, 1996). Estes aminoácidos são secretados pelas células do oviduto em co-cultura, indicando que os efeitos da co-cultura celular podem, em parte, ser devido à produção dos aminoácidos glicina e alanina (Moore e Bondioli, 1993).

2.1.3 Glicina

A glicina é um NEA, de cadeia lateral apolar, estruturalmente simples, podendo ser degradado e liberando o piruvato (Nelson e Cox, 2011).

Por função, a glicina apresenta alta capacidade osmorreguladora e osmoprotetora celular, principalmente em meios de cultivo com alta osmolaridade (330 mOsm), permitindo o desenvolvimento embrionário (Moraveck et al., 2012). Embriões humanos e de ratos possuem canais específicos de transporte da glicina, facilitando a atividade osmorreguladora (Hammer et al., 2000). O consumo de glicina na fase de compactação foi evidenciado por Li et al. (2006), relacionado à atividade osmorreguladora na formação da blastocle.

Em meio quimicamente definido, utilizando álcool polivinílico (PVA) em substituição a BSA, no CIV de embriões bovinos, a glicina mostrou incremento significativo o número de células de blastocistos (Lee e Fukui, 1996); em suínos, a glicina mostrou aumento do diâmetro e contagem de células, com redução da apoptose celular devido ao efeito sinérgico da glicina e glicose (Mito et al., 2011).

2.2 TOXICIDADE CAUSADA POR AMONÍACO ORIUNDO DE AMINOÁCIDOS NA PIVE

Compostos amoníacos são subprodutos oriundos do metabolismo celular ou da degradação química ocorrida em aminoácidos específicos (glutamina) no meio de cultivo (Gardner e Lane, 1993; Christie e Butler, 1994).

Gardner e Lane (1993) demonstraram que a produção de amoníaco pelo embrião é basal e que, na avaliação do meio de cultivo contendo aminoácidos, os valores da concentração de amoníaco aumentaram significativamente após 96 horas de CIV, indicando uma quebra espontânea de aminoácidos.

In vitro, a glutamina apresenta acentuada instabilidade em soluções aquosas, degradando-se espontaneamente em amoníaco e ácido-2-pirrolidona-5-carboxílico, que se acumulam no meio de cultivo onde estão presentes os oócitos e embriões (Summers et al., 2005). Os prejuízos são observados pela estática do cultivo *in vitro*, onde os zigotos e embriões são cultivados em microgotas (Gardner e Lane, 1993).

O acúmulo do amoníaco no meio de cultivo tem dois fatores prejudiciais, quando no cultivo de embriões bovinos: temperatura e duração da incubação.

Em bovinos, a temperatura de incubação varia entre 38,5°C a 39,5°C (Varago et al., 2008), exacerbando os efeitos da degradação da glutamina, encontrados também no cultivo de embriões de camundongo e humanos a 37°C (Lane e Gardner, 2003; Stevanato, 2009).

A duração do CIV também é outro fator a influenciar, uma vez que o período para bovinos é de sete dias, diferente de outras espécies, aumentando linearmente o acúmulo de amoníaco (Gardner e Lane, 1993; Gonçalves et al., 2007).

Como efeito do acúmulo de amoníaco, Tareq et al. (2007) observaram redução da taxa de maturação de oócitos suínos.

No processo de FIV, em embriões de ratos, não foram encontradas evidências que mostram a interferência da glutamina nas taxas de fertilização e implantação, retardo no desenvolvimento fetal ou desenvolvimento anormal de fetos (Summers et al., 2005). Em suínos, houve redução da motilidade e reação acrossomal de espermatozoides (Tareq et al., 2008).

No CIV de ratos, observou-se a redução do número de blastocistos e da qualidade embrionária, com a redução do total de células embrionárias (Gardner e Lane, 1993). Também foram observadas alterações e retardo no desenvolvimento fetal, expressão gênica, consumo da glicose, regulação do pH celular e redução significativa na viabilidade embrionária e da capacidade de estabelecer prenhez (Lane e Gardner, 1998; Lane e Gardner, 2003; Sinawat et al., 2003). Em embriões de ratos, existe divergência entre autores quanto à observação de alterações no desenvolvimento fetal (Biggers et al., 2004b; Summers et al., 2005).

Apesar dos efeitos gerados, o desenvolvimento embrionário não é impedido pelo acúmulo de amoníaco, mesmo em altas concentrações de glutamina. No entanto, a qualidade embrionária pode ser intensamente prejudicada, refletindo na produção de blastocistos e nos índices de prenhez (Gardner e Lane, 1993; Lane e Gardner, 2003).

Em humanos, baixos níveis de amônia e glutamina no meio de cultura estão relacionados à maior ocorrência de gestação (Stevanato, 2009).

A redução da concentração da glutamina não é uma alternativa devido a sua importância para o metabolismo celular, mas os efeitos negativos da acumulação de amoníaco podem ser eficientemente reduzidos com a utilização de dipeptídeos como o alanil-glutamina e glicil-glutamina (Roth et al., 1988). A troca parcial do meio de cultivo *in vitro* (feeding) foi sugerida como uma ferramenta para redução dos efeitos dos compostos amoníacos (Gardner e Lane, 1993) e tem sido utilizada em laboratórios comerciais de PIVE de bovinos. A utilização dos dipeptídeos pode ser uma ferramenta complementar à realização da troca parcial do meio CIV em práticas comerciais da produção de embriões *in vitro*.

2.3 DIPEPTÍDEOS ALANIL-GLUTAMINA E GLICIL-GLUTAMINA

A utilização da alanil-glutamina (Ala-gln) e glicil-glutamina (Gli-gln) tem como fundamento básico a redução de compostos amoníacos liberados pela glutamina. Estudos mostram a aplicação de dipeptídeos nas etapas de MIV, FIV e CIV de embriões de diferentes espécies como humanos (Stevanato, 2009), ratos (Summers et

al., 2005), camundongos (Moraveck et al., 2012) e suínos (Tareq et al., 2007; Tareq et al., 2008, Kim et al., 2013; Tareq et al., 2013).

Os dipeptídeos Ala-gln e Gli-gln são compostos estáveis em soluções aquosas e a temperaturas superiores a 120°C (Eagle, 1955; Roth et al., 1988), permitindo a redução dos níveis de compostos amoníacos liberados no meio de cultivo (Christie e Butler, 1994). Segundo estes autores, a clivagem dos dipeptídeos é dependente de uma peptidase, extracelular, liberando os aminoácidos para serem utilizados no metabolismo celular gradativamente.

Em embriões, peptidase semelhante foi observada em células do trofoblasto (Fujiwara et al., 2005; Fujiwara, 2007). Sugere-se, portanto, a possibilidade de zigotos, ainda nas primeiras clivagens, terem capacidade de segregar tais peptidases (Moraveck et al., 2012).

É importante salientar que existe a produção de amoníaco mesmo na presença de dipeptídeos, mas, em menores concentrações, tornando o ambiente de cultivo *in vitro* menos tóxico que quando se utiliza a glutamina no cultivo embrionário.

Na comparação entre os dipeptídeos, a liberação de amoníaco foi maior na utilização de Ala-gln, mostrando uma maior afinidade da enzima na hidrólise do Ala-gln e menor para Gli-gln, exigindo maiores concentrações de Gli-gln no meio de cultivo (Christie e Butler, 1994). De acordo com os autores, na presença da Ala-gln, a produção de amoníaco é influenciada pela presença de SFB, comumente empregado nos meios de cultivo de embriões e está relacionado à atividade da peptidase, acelerando processo de hidrólise, o que não ocorre na presença da Gli-gln devido à baixa afinidade.

2.3.1 Importância na produção e qualidade de embriões

Com as diferentes exigências de aminoácidos observados nas diferentes fases embrionárias, Lane e Gardner (1997a) propuseram a avaliação não só das taxas de desenvolvimento embrionário, mas de indicadores de viabilidade, como a contagem total de células embrionárias e a proporção da diferenciação celular TE e ICM.

A diferença na contagem total e na proporção de TE e ICM de embriões *in vitro* em relação aos obtidos *in vivo* foi significativamente diferente, sendo o número total de células superior em embriões produzidos *in vivo* (Iwasaki et al., 1990).

O aumento na contagem de células de embriões PIVE está relacionado com a utilização do dipeptídeo na fase de CIV e não tem relação com a utilização do dipeptídeo na MIV. Segundo Kim et al. (2013), a contagem total de células de embriões suínos partenogênicos não foi influenciada pela presença de Ala-gln no meio de MIV, mas foi superior ($p < 0,05$) quando Ala-gln foi utilizada no meio de CIV, mostrando que o número de células está relacionado com o dipeptídeo no CIV.

2.3.2 Efeito dos dipeptídeos Alanil-glutamina e glicil-glutamina na MIV

A maturação *in vitro* envolve dois processos, a maturação nuclear e a citoplasmática. A maturação nuclear consiste na retomada e progressão da meiose até o estágio de metáfase II da meiose II e a extrusão do primeiro corpúsculo polar (Varago et al., 2008). Uma vez retirado do fluido folicular, que contém inibidores da maturação, a retomada e progressão da meiose ocorre independente das condições ofertadas no meio de cultivo (Gonçalves et al., 2007). A maturação citoplasmática é um processo de difícil avaliação e consiste basicamente na reorganização das organelas citoplasmáticas e na síntese de mRNA (Gonçalves et al., 2007).

A ocorrência dos dois processos de maturação, nuclear e citoplasmático, permite ao oócito que, quando fecundado, tenha potencial para o desenvolvimento embrionário (Gonçalves et al., 2007; Varago et al., 2008) sendo a produção de blastocistos um fator fidedigno de avaliação indireta da maturação oocitária.

No estudo de Kim et al. (2013), utilizando oócitos suínos maturados em meios contendo Ala-gln e glutamina, ativados por partenogênese, observou-se que a taxa de clivagem em embriões com mais de oito células foi maior ($p < 0,05$) no grupo Ala-gln (33%) em comparação ao grupo com glutamina (16,7%). Não houve diferença entre os grupos na primeira clivagem, indicando que quando utilizado Ala-gln houve uma melhora da competência dos oócitos para prosseguir com o desenvolvimento embrionário após a primeira clivagem. No mesmo estudo, não houve diferença estatística na taxa de maturação nuclear de oócitos suínos.

Aumento nas taxas e aceleração da maturação de oócitos suínos foram observados na presença de dipeptídeos em suínos por Tareq et al. (2007) e Tareq et al. (2013).

Quando utilizados somente na MIV, os dipeptídeos não apresentaram aumento na taxa de blastocistos e contagem do número de células em embriões suínos (Kim et al., 2013).

2.3.3 Efeito dos dipeptídeos Alanil-glutamina e glicil-glutamina na FIV

Na FIV, ocorre o processo de capacitação espermática e a união do gameta masculino e feminino. Os oócitos maturados são colocados junto aos espermatozoides selecionados e em processo de capacitação para que ocorra a fertilização *in vitro*. Poucos relatos tratam da FIV com utilização de dipeptídeos.

Foi observado, em suínos, maior taxa de fertilização monospérmica na presença de dipeptídeos (Tareq et al., 2007) e aumento na taxa de reação acrossomal e a aumento da motilidade espermática em meio de seleção e capacitação espermática, tendo efeito sinérgico sobre a taxa de utilização de glicose pelo espermatozoide (Tareq et al., 2008).

A Gli-gln, quando utilizada na FIV, favoreceu o desenvolvimento da ICM e reduziu o número de núcleos picnóticos e fragmentados em blastocistos de ratos (Summers et al., 2005).

2.3.4 Efeito dos dipeptídeos Alanil-glutamina e glicil-glutamina no CIV

O processo de cultivo *in vitro* é o período de desenvolvimento (pré-implantação) do zigoto até o estágio de blastocisto. Compreende todas as clivagens, a primeira diferenciação celular (trofoblasto e embrioblasto), formação da blastocela e ruptura da zona pelúcida com a eclosão embrionária.

O aumento na taxa de blastocistos, eclosão e contagem do número de células do ICM e TE são parâmetros relacionados à utilização do dipeptídeo Ala-gln no CIV. O dipeptídeo Gli-gln tem como efeitos principais o incremento na contagem de ICM e TE, favorecendo o desenvolvimento da ICM, sem efeitos sobre as taxas de blastocisto em ratos (Biggers et al., 2004a).

Em suínos, foi observado aumento da taxa de desenvolvimento em todos os estágios embrionários utilizando dipeptídeos associados na proporção 1:1 com 2mM de concentração (Tareq et al., 2013).

O único dado encontrado (Hagemann et al., 1998) da aplicação de dipeptídeos no CIV de embriões bovinos trata do desenvolvimento de um sistema de cultivo individual com utilização de meio comercial (Glutamax-II®) na substituição da glutamina. Neste trabalho, não foram encontradas diferenças nos parâmetros de taxa de blastocistos e número de células. Os sistemas de cultivo individual poderiam ter desfavorecido a avaliação do dipeptídeo, uma vez que em sistemas individuais não se observa a interação sinérgica de efeitos estimulatórios parácrinos no desenvolvimento dos embriões.

2.3.5 Utilização de dipeptídeos Alanil-glutamina e glicil-glutamina na produção *in vitro* de embriões

As informações sobre os efeitos dos dipeptídeos na promoção da maturação *in vitro* de oócitos e no cultivo *in vitro* de embriões bovinos são relativamente escassas. O aumento do número de células é o principal fator para a recomendação da utilização dos dipeptídeos, permitindo o incremento na taxa de prenhez de embriões PIVE por melhorar a qualidade embrionária *in vitro*.

A utilização da Ala-gln é recomendada por Kim et al. (2013) na MIV e CIV para promover o aumento na contagem de células e melhorar a competência oocitária para o desenvolvimento embrionário.

Moraveck et al. (2012) mostram que outros dipeptídeos como glicil-glicina e alanil-glicina podem ser utilizados como osmorreguladores e osmoprotetores, no entanto, menos eficientes que seus respectivos aminoácidos isolados, gerando um questionamento quanto a capacidade de transporte dos dipeptídeos pelas células embrionárias.

Em bubalinos, ovinos e caprinos não foram encontrados relatos utilizando dipeptídeos isolados ou associados na forma de Ala-gln e Gli-gln no MIV, FIV e CIV. Para bovinos, o relato encontrado não tinha como objetivo a avaliação da aplicação do dipeptídeo (Hagemann et al., 1998).

Extrapolando as informações encontradas em outras espécies, a utilização de dipeptídeos em embriões de ruminantes necessita de estudos completos, avaliando todas as fases da PIVE, principalmente em bovinos por se tratar da espécie na qual a biotecnologia está mais desenvolvida e pela demanda do Brasil na produção de embriões *in vitro* bovinos.

CAPÍTULO 3

3 DIPEPTÍDEOS ALANIL-GLUTAMINA E GLICIL-GLUTAMINA NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS E CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO* (Dipeptide alanyl-glutamine and glycyl-glutamine on maturation of oocytes and culture of *in vitro* bovine embryos)

RESUMO

Os dipeptídeos alanil-glutamina (Ala-gln) e Glicil-glutamina (Gli-gln) têm sido estudados na produção *in vitro* de embriões em substituição à glutamina em diversas espécies. Os principais benefícios dos dipeptídeos são a redução de compostos amoníacos no meio de cultivo, aumento da produção embrionária e da contagem total de células e/ou da massa celular interna. O objetivo desta pesquisa é estudar os efeitos dos compostos estáveis alanil-glutamina e glicil-glutamina em substituição aos aminoácidos glutamina, alanina e/ou glicina na maturação *in vitro* (MIV) de oócitos e no cultivo *in vitro* (CIV) de embriões bovinos, com a finalidade de se determinar os efeitos sobre a produção e qualidade dos embriões produzidos *in vitro*. O experimento 1 avaliou Ala-gln em substituição à glutamina na MIV. O experimento 2 avaliou Gli-gln em substituição à glutamina na MIV. Os experimentos 3 e 4 avaliaram duas diferentes concentrações de Ala-gln e Gli-gln associados na substituição da glutamina, alanina e glicina no CIV. No experimento 5, foram preparados dois grupos tratados, sendo Ala-gln adicionado de glicina e Gli-gln adicionado de alanina substituindo glutamina e alanina ou glicina. A avaliação dos embriões foi realizada por meio da cinética de desenvolvimento *in vitro* nos dias 3 (d3), 7 (d7) e 8 (d8) de CIV e da qualidade embrionária, pela contagem total de células. Não houve diferença ($p>0,05$) na taxa de clivagem entre os grupos tratados e controle independente da etapa de aplicação (MIV ou CIV) dos dipeptídeos. Ala-gln, quando utilizado na MIV, aumentou ($p<0,05$) a taxa de blastocistos (d7) e o total de embriões em d7 e d8, Gli-gln não diferiu ($p>0,05$) nos parâmetros avaliados em relação ao controle. No CIV, quando Ala-gln e Gli-gln foram utilizados associados em maior concentração, houve uma redução ($p<0,05$) na taxa de blastocistos expandidos, total de embriões (d7) e eclosão embrionária (d8). Quando os dipeptídeos foram

adicionados separadamente, com a adição do aminoácido alanina e/ou glicina de acordo com o dipeptídeo, observou-se redução do total de embriões em d7 e d8 ($p < 0,05$) para ambos os grupos tratados em relação ao controle, e da eclosão embrionária para Gli-gln adicionado de alanina em relação ao Ala-gln adicionado de glicina e controle. Houve redução na contagem total de células quando os dipeptídeos foram aplicados associados no CIV, mas não quando os dipeptídeos foram utilizados separados nas etapas de MIV e CIV. Conclui-se que Ala-gln pode ser utilizado como substituto da glutamina em meios MIV, aumentando a produção embrionária, sem interferir na qualidade embrionária, mas não se recomenda a utilização dos dipeptídeos em conjunto ou isolados na etapa de CIV.

Palavras-chave: Alanil-glutamina. Glicil-glutamina. Oócitos. Embriões *in vitro*.

ABSTRACT

The dipeptide alanyl-glutamine (Ala-Gln) and glycyl-glutamine (Gln-Gly) have been studied in *in vitro* production of embryos in substitution of glutamine in several species. The main benefits of the dipeptide compounds are the reduction of ammonia in the culture medium, increased embryo production and increased total cells count and/or the inner cell mass. The objective of this research is to study the effects of stable compounds alanyl-glutamine and glycyl-glutamine to replace the amino acid glutamine, alanine and/or glycine in *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes and *in vitro* culture (IVC) of bovine embryos in order to determine the effects on the yield and quality of bovine embryos produced *in vitro*. The evaluation was performed by *in vitro* development kinetics on days 3 (d3), 7 (d7) and 8 (d8) of IVC and embryo quality by total cells count. In the experiment 1, it was evaluated Ala-gln replacing glutamine in IVM. The experiment 2, it was evaluated Gli-gln replacing glutamine in IVM. The experiments 3 e 4 evaluated two different concentrations of dipeptides Ala-gln and Gly-gln in replacement of glutamine, alanine and glycine. In the experiment 5 were prepared two treated groups, Ala-gln added with glycine and the Gly-gln added with alanine. There was no difference ($p > 0.05$) in cleavage rate between treated groups and control groups, no matter the implementation phase (IVM or IVC) of the dipeptide. Ala-gln when

used in IVM increased ($p < 0.05$) the blastocyst rate (d7) and the total number of embryos ind 7 and d8. Gli-gln showed no differences in all parameters evaluated. In IVC, when Ala-Gln and Gly-Gln were used in combination, there was a reduction ($p < 0.05$) in the expanded blastocyst rate, total number of embryos (d7) and of embryo hatching (D8). When dipeptides were added separately, with the addition of alanine and/or glycine dipeptide, according to the amino acid, there was a reduction ($p < 0.05$) in the total number of embryos (d7 and d8) and in embryo hatching (d8) when the Gly-Gln was used with addition of alanine. There was a reduction in total cell count when dipeptides were used together in IVC, but not when they were used alone in IVM and IVC. We conclude that Ala-Gln can be used as a substitute for glutamine in IVM media, increasing embryo production, without interfering with embryo quality, but it is not recommended the use of dipeptides together or isolated in IVC.

Keywords: Alanyl-glutamine. Glycyl-glutamine. Oocytes. In vitro embryos.

3.1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem apresentado particular interesse na produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos nos últimos anos, com aproximadamente 350 mil embriões produzidos em 2012 (IETS, 2013). A PIVE mostrou um intenso crescimento na última década com a produção em larga escala e a otimização da produção através da criopreservação e utilização do sêmen sexado (Pontes et al., 2010).

Os aminoácidos tiveram importante contribuição no incremento das taxas da PIVE e estão associados a diferentes fases do desenvolvimento embrionário (Rieger et al., 1992b). Entre os efeitos de aminoácidos essenciais e não-essenciais estão o aumento das taxas das primeiras clivagens, produção de blastocistos, eclosão embrionária, contagem total de células e da proporção da massa celular interna (ICM) em relação às células do trofoblasto (TE) (Tiffin et al., 1991; Rosenkrans e First, 1994; Lane e Gardner 1997a; Steeves e Gardner, 1999; Humpherson et al., 2005).

Entre os aminoácidos não-essenciais estão a glutamina, alanina e glicina. O metabolismo da glutamina foi estudado em embriões de diversas espécies como

humanos (Devreker et al., 1998), suínos (Petters et al., 1990; Swain et al., 2002; Booth et al., 2005), bovinos (Tiffin et al., 1991, Rieger et al., 1992b) e ratos (Chatot et al., 1990). Estudos mostram a participação deste aminoácido no ciclo de Krebs e no metabolismo da glicose (Chatot et al., 1990; Tiffin et al., 1991), na osmorregulação (Steeves e Gardner, 1999), na redução da peroxidação lipídica (Rieger, 1992) e na síntese de purinas e pirimidinas (Leese et al., 1993). Associando a utilização de glutamina em meios de cultivo embrionário, há um aumento significativo na produção de blastocistos, conseqüentemente reduzindo as taxas de embriões que não se desenvolvem *in vitro* (Carney e Bavister, 1987).

A associação da glutamina com outros aminoácidos não-essenciais, como a alanina e glicina, demonstrou efeito sinérgico, estimulando o desenvolvimento embrionário inicial (Steeves e Gardner, 1999). Intenso consumo de glutamina foi observado na fase de compactação e formação da blastocele, nas fases finais de desenvolvimento pré-implantacional (Rieger et al., 1992a).

Em soluções aquosas e temperaturas superiores a 37°C ocorre a degradação da glutamina, em amoníaco e ácido-2-pirrolidona-5-carboxílico (Summers et al., 2005). O acúmulo de amoníaco no meio de cultivo é prejudicial ao desenvolvimento embrionário (Lane e Gardner, 2003; Tareq et al., 2007; Tareq et al., 2008). Este acúmulo do amoníaco é agravado com a estática do cultivo *in vitro* e a temperatura elevada (38,5 a 39°C) utilizada para bovinos (Lane e Gardner, 2003; Varago et al., 2008; Stevanato, 2009).

Mecanismos de resposta metabólica são observados, com a síntese constante de alanina nas fases finais de desenvolvimento, sugerindo o envolvimento da alanina na reciclagem de íons amoníacos gerados da degradação da glutamina (Lee e Fukui, 1996; Partridge e Leese, 1996; Orsi e Leese, 2004; Humpherson et al., 2005). Alanina apresenta sinergismo quando associado à glicina (Lee e Fukui, 1996), principalmente pela atividade osmorreguladora destes aminoácidos, sendo a glicina significativamente consumida durante a formação da blastocele (Li et al., 2006).

Os dipeptídeos foram sugeridos como alternativa no controle do acúmulo de amoníaco, sendo aplicados em substituição à glutamina (Christie e Butler, 1994). Os dipeptídeos são compostos estáveis a altas temperaturas (120°C), sendo clivados por

peptidase extracelular liberando os aminoácidos gradativamente para o metabolismo celular e, conseqüentemente, reduzindo os níveis de amoníaco livre no meio de cultivo *in vitro* (Eagle, 1955; Roth et al., 1988; Christie e Butler, 1994).

Os dipeptídeos alanil-glutamina (Ala-gln) e glicil-glutamina (Gli-gln), entre outros, foram avaliados na maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) de embriões de humanos (Stevanato, 2009), ratos (Summers et al., 2005), camundongos (Moraveck et al., 2012) e suínos (Tareq et al., 2007; Tareq et al., 2008; Kim et al., 2013; Tareq et al., 2013). Os resultados mostram redução dos níveis de compostos amoníacos, melhora na competência oocitária, aumento das taxas de clivagem, maiores taxas de fertilização monospérmica, aumento da reação acrossomal e motilidade espermática, aumento na produção de blastocistos, incremento na eclosão embrionária, contagem total de células, maior desenvolvimento da ICM e na proporção ICM e TE.

O objetivo desta pesquisa foi estudar os compostos estáveis alanil-glutamina e glicil-glutamina em substituição aos aminoácidos glutamina, alanina e/ou glicina na maturação *in vitro* de oócitos e no cultivo *in vitro* de embriões bovinos, com a finalidade de se determinar os efeitos sobre a produção e qualidade dos embriões.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de ética no uso de animais – PUCPR sob o número de registro 844/2013.

3.2.1 Recuperação de oócitos e maturação *in vitro* (MIV)

Os oócitos foram recuperados de ovários de fêmeas bovinas sem raça definida, não gestantes e com a presença de corpo lúteo em um dos ovários, abatidas em frigorífico comercial da Região Metropolitana de Curitiba-PR. Os ovários foram transportados ao Laboratório Experimental de Cultivo Celular pertencente ao Núcleo de Tecnologia Celular – PUCPR, em garrafa térmica contendo solução fisiológica 0,9% em temperatura de 33-37°C, com no máximo 2 horas de coleta. Aleatoriamente, os ovários foram contidos em gaze e o complexo cumulus-oócito (COCs) foi recuperado de

folículos de 3-8 mm de diâmetro, utilizando agulha 18 gauge acoplada a seringa de 10 mL. O conteúdo da aspiração foi depositado em placas de petry de 60 mm.

Com auxílio de estereomicroscópio, oócitos de grau 1 e 2, segundo classificação de Stojkovic et al. (2001) (Anexo I), foram selecionados e recuperados, utilizando micropipetadores, e depositados em meio Sperm-TALP, composto por conjunto de sais fisiológicos tamponado. Em seguida, os oócitos foram lavados em três gotas de meio de MIV para remoção de debris celulares. Grupos de 25 a 30 oócitos/gota foram transferidos para placa de MIV, formada em placas de petry de 35mm, sendo 7 gotas de 80 µL de meio MIV por placa. Os oócitos foram maturados por 22-24 horas. Para retirar a influência das fêmeas sobre o processo, um número mínimo de 6 grupos de oócitos foi submetido ao processo em cada grupo experimental.

O meio MIV é constituído por TCM 199 (Sigma-Aldrich, USA) contendo 0,06849 mM/mL de glutamina (Sigma-Aldrich, USA), 10% de soro fetal bovino (SFB) padronizado (GIBCO®), piruvato 22 µg/mL (Sigma-Aldrich, USA), hormônio folículo estimulante (FSH) 0,5 µg/ml (Folltropin®), hormônio luteinizante (LH) 10 UI/mL (Chorulon®), estradiol 1 µg/mL (Sigma-Aldrich, USA) e sulfato de amicacina 0,1 mg/mL (Novamin®).

3.2.2 Seleção espermática

O gradiente de seleção espermática foi formado utilizando-se como base o gradiente comercial Bovipure (Nidacon International AB, Suécia), depositando-se em eppendorf o volume de 400 µL de Bovipure e 400 µL de de Bovipure e Sperm-TALP homogenizado na proporção 1:1. O período de estabilização da temperatura do gradiente foi de 30 minutos antes da descongelação do sêmen.

O sêmen criopreservado foi descongelado em banho-maria a 35°C por 30 segundos. A palheta, após homogenizada, foi aberta e o sêmen depositado lentamente sobre o gradiente. A centrifugação ocorreu em microcentrífuga (Eppendorf, Alemanha) por 12 minutos a 880 g. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi diluído em meio FIV. A dose inseminante foi de 10µL na concentração de 2×10^6 espermatozoides/mL.

Foram utilizados dois reprodutores da raça Angus, selecionados por meio de teste de produção *in vitro* de embriões, utilizando o protocolo controle e tendo como critério a taxa de produção embrionária superior a 20%. O reprodutor A foi utilizado nos experimentos onde o dipeptídeo foi utilizado na MIV e o reprodutor B, em todos os experimentos nos quais os dipeptídeos foram utilizados no CIV.

3.2.3 Fertilização *in vitro* (FIV)

O meio FIV é constituído de Fert-TALP, formado por conjunto de sais fisiológicos, adicionado de 0,6 g/L de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA-FAF), piruvato 22 µg/mL, PHE 440 µg/mL (Sigma-Aldrich, USA), heparina 10 UI/mL e sulfato de amicacina 0,1 mg/mL (Novamin®).

As placas foram montadas seguindo o mesmo padrão da MIV. Os espermatozoides selecionados foram depositados nas gotas de FIV e incubados por 15 minutos. Na sequência, os oócitos foram retirados da placa de MIV, lavados (1X) em meio FIV e transferidos para meio FIV na placa de fertilização. A fertilização ocorreu por 18-22 horas.

3.2.4 Cultivo *in vitro* (CIV)

O meio CIV teve como base o meio CR2 composto por conjunto de sais fisiológicos, suplementado com 0,005g/mL de BSA-FAF(Sigma-Aldrich, USA), 5% de SFB (GIBCO®), 0,00034 mM/mL de glutamina, 0,1 mM/mL de alanina e 0,1mM/mL de glicina (Sigma-Aldrich, USA) e sulfato de amicacina 0,1 mg/mL(Novamin®). As placas foram montadas com 7 gotas de 60 µL de meio CIV.

Os zigotos foram transferidos para uma gota de 100µL de meio FIV para remoção parcial do cumulus, seguidamente lavados (3X) em gotas de meio CIV e transferidos para placa de CIV, onde permaneceram por sete dias.

Todo o processo de PIVE ocorreu em incubadora (Thermo Scientific, USA) jaquetada a água com pressão de CO₂ a 5% em ar livre, umidade saturada e temperatura de 38,7°C. Os meios de cultivo seguiram seus padrões, controlados pelo pH (7,2 a 7,4) e osmolaridade 295 a 305 mOsm. Todas as placas de cultivo nas fases de MIV, FIV e CIV eram cobertas por óleo mineral (Sigma-Aldrich, USA). No dia 3, o

feeding consistiu da troca parcial (50%) do volume das gotas contendo zigotos na placa de CIV, adicionando o mesmo volume do meio CIV mantido em incubadora. A função do feeding é reduzir a concentração de compostos tóxicos presentes na gota onde estão condicionados os embriões.

3.2.5 Delineamento Experimental

A avaliação da substituição dos aminoácidos por dipeptídeos (grupo tratado) na comparação com grupo controle (utilizando os aminoácidos isolados) foi realizada em cinco experimentos, onde foram testadas diferentes concentrações de Ala-gln e Gly-gln em substituição à glutamina, glicina e/ou alanina. Em cada grupo (tratado e controle), foram realizadas no mínimo 6 repetições para cada experimento. Cada repetição consiste em um grupo de 25 a 30 oócitos maturados. O valor de (n) é a soma das repetições.

Experimento 1– Em meio MIV, a glutamina, concentração de 0,06849 mM/mL, foi substituída por peso molar equivalente do dipeptídeo Alanil-glutamina (Sigma-Aldrich, USA).

Experimento 2– Em meio MIV, a glutamina, concentração de 0,06849 mM/mL, foi substituída por peso molar equivalente do dipeptídeo Glicil-glutamina (Sigma-Aldrich, USA).

Experimento 3– Em meio CIV, a glutamina, concentração de 0,00034 mM/mL, a alanina, 0,1 mM/mL e a glicina, 0,1mM/mL, foram substituídas por peso molar equivalente dividido em valores iguais entre os dipeptídeos Alanil-glutamina e Glicil-glutamina (Sigma-Aldrich, USA).

Experimento 4– Em meio CIV, a glutamina, concentração de 0,00034 mM/mL, a alanina, 0,1 mM/mL, e a glicina, 0,1mM/mL, foram substituídas por 0,6 mM de Alanil-glutamina e 2 mM Glicil-glutamina (Sigma-Aldrich, USA).

Experimento 5– Em meio CIV, a glutamina, concentração de 0,00034 mM/mL, foi substituída juntamente com a alanina, 0,1 mM/mL, ou glicina, 0,1mM/mL, formando 2 grupos tratados: a) Alanil-glutamina associado à glicina isolada e b) Glicil-glutamina associado à alanina isolada (Sigma-Aldrich, USA).

Os efeitos dos dipeptídeos na MIV e CIV foram avaliados por meio de parâmetros de cinética de desenvolvimento, produção e qualidade de embriões *in vitro*.

3.2.6 Avaliação da cinética de desenvolvimento e produção de embriões *in vitro*

A avaliação embrionária foi realizada com auxílio de estereomicroscópio no aumento de 200x. A avaliação foi realizada individualmente para cada grupo de zigotos da placa de CIV. Tabelas auxiliares foram utilizadas para a anotação dos dados experimentais. No dia 3 (d3) do CIV, zigotos com dois ou mais blastômeros foram contados, formando a taxa de clivagem em relação ao número inicial de zigotos. No dia 7 e 8 (d7 e d8) do CIV, o número de embriões no estágio de blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido foram contados, sendo a soma dos três estágios embrionários correspondente ao total de embriões produzidos (Anexo II). As taxas de produção embrionária (clivagem, blastocisto, blastocisto expandido, blastocisto eclodido e total de embriões em d7 e o total de embriões em d8), são apresentadas em porcentagem e foram calculadas em relação ao número de zigotos no d1 de CIV. No dia 8 (d8), foi também calculada a taxa de eclosão embrionária, com base no número de embriões eclodidos em d8 em relação ao total de embriões em d7.

3.2.7 Avaliação da qualidade dos embriões

A avaliação da qualidade dos embriões foi realizada por meio da contagem total de células de embriões eclodidos no d8 de CIV. Para a contagem total de células, os embriões eclodidos foram transferidos para solução permeabilizante de membrana celular TBS-Triton 1x em gota de 100 μL por 5 minutos e, posteriormente, depositados em gota de 60 μL de DAPI (Sigma-Aldrich, USA), corante de núcleo celular, na concentração de 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ por 10 minutos.

Todo o processo ocorreu em placa aquecida a 37°C e a manipulação com auxílio de micropipetador e esteromicroscópio em luz mínima. As lâminas foram montadas depositando-se as estruturas em gota de 10 μL de glicerol (Sigma-Aldrich, USA), sob lamínula. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência LEICA DM4000 e as imagens capturadas pelo software LAS-AF individualmente para cada

embrião eclodido. Os núcleos corados em azul foram somados, contabilizando o total de células por embrião.

3.2.8 Análise estatística

As taxas de produção e a contagem total de células embrionárias foram avaliadas utilizando a análise de variância (ANOVA), com comparação das médias pelo teste de Duncan's (*Multiple Range Test*), levando em consideração o número de médias envolvidas. Quando não se obteve homogeneidade de variância, a comparação das médias foi realizada pelo teste Bonferroni. Significância estatística é observada com $p < 0,05$. O software Statgraphics® Centurion XVI foi utilizado para a realização das análises estatísticas.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Taxas de Clivagem

Na tabela 1 são apresentados os dados de clivagem no dia 3 (d3) dos experimentos realizados. Não foi encontrada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos tratados e os grupos controle em nenhum dos experimentos.

Tabela 1: Porcentagem (%) média e desvio padrão da taxa de clivagem, no dia 3 (d3) de cultivo *in vitro*.

| Experimento | Grupo | n | Taxa de clivagem (%) ¹ (média/desvio padrão) |
|-------------|---------------------------------|-----|--|
| 1 - MIV | Controle | 181 | 67,02±10,93 ^a |
| | Ala-gln | 186 | 70,43±10,09 ^a |
| 2 - MIV | Controle | 285 | 67,99±12,23 ^a |
| | Gli-gln | 339 | 69,13±10,91 ^a |
| 3- CIV | Controle | 245 | 79,42±10,63 ^a |
| | Ala-gln e Gli-gln | 317 | 72,92±11,55 ^a |
| 4- CIV | Controle | 357 | 75,01±10,64 ^a |
| | Ala-gln (0,6mM) e Gli-gln (2mM) | 352 | 77,37±7,12 ^a |
| 5- CIV | Controle | 179 | 76,98±11,68 ^a |
| | Ala-gln e glicina | 188 | 69,63±6,43 ^a |
| | Gli-gln e alanina | 161 | 75,27±6,87 ^a |

Letras diferentes na coluna entre os tratamentos de cada experimento indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

n – número de zigotos em d1

¹Taxa de clivagem (%) de zigotos com ≥ 2 células, calculada em relação ao número de zigotos (n).

As taxas de clivagens observadas são semelhantes às encontradas por outros autores para zigotos bovinos (Zhang et al., 1995; Wang et al., 1997; Hagemann et al., 1998; Orsi e Leese, 2004; Li et al., 2006).

3.3.2 Produção embrionária *in vitro*

Nas tabelas 2 e 3 são mostradas as médias e desvio padrão em todos os estágios embrionários e a média do total de embriões dos experimentos para os dias 7 e 8 de CIV, respectivamente, para os experimentos 1 e 2 utilizando os dipeptídeos na etapa de MIV.

Com a substituição da glutamina por Ala-gln no meio MIV (experimento 1) foi possível observar diferença estatística ($p < 0,05$) na média de blastocisto em d7 (Tabela 2) e o total de embriões em d7 e d8 em relação ao grupo controle (Tabela 2 e 3), mostrando um efeito positivo do dipeptídeo Ala-gln sobre a produção de embriões *in*

vitro bovino quando aplicado no meio MIV aumentando a produção embrionária em mais de 10%. A utilização do Gli-gln no meio MIV não mostrou diferença estatística ($p>0,05$) nos parâmetros avaliados (Tabela 2 e 3).

Tabela 2: Porcentagem (%) média e desvio padrão para produção embrionária no dia 7 (d7) de cultivo *in vitro*, nos estágios de blastocistos, blastocistos expandidos, blastocistos eclodidos e total de embriões bovinos utilizando dipeptídeos na MIV.

| Ex | Grupo | n | Produção embrionária no dia 7 (%) | | | |
|---------|----------|-----|-----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| | | | (média±desvio padrão) | | | |
| | | | Blastocistos ¹ | Blastocistos Expandidos ¹ | Blastocistos Eclodidos ¹ | Total de Embriões ¹ |
| 1 - MIV | Controle | 181 | 15,61±6,17 ^a | 5,05±5,94 ^a | 1,14±1,95 ^a | 21,82±11,34 ^a |
| | Ala-gln | 186 | 25,09±7,05 ^b | 6,44±1,81 ^a | 2,12±1,99 ^a | 33,66±6,79 ^b |
| 2 - MIV | Controle | 285 | 14,66±10,25 ^a | 1,73±2,55 ^a | 1,11±2,73 ^a | 17,51±10,90 ^a |
| | Gli-gln | 339 | 17,36±10,18 ^a | 3,54±3,02 ^a | 2,17±4,07 ^a | 23,08±9,98 ^a |

Letras diferentes na coluna entre os tratamentos de cada experimento indicam diferença estatística ($p<0,05$).

n: número de zigotos em d1; Ex: Experimento; ¹Taxa de diferentes estágios embrionários e total de embriões calculada pelo número de zigotos (n).

Tabela 3: Porcentagem (%) média e desvio padrão para eclosão embrionária e total de embriões no dia 8 (d8) de cultivo *in vitro* utilizando dipeptídeos na MIV.

| Ex | Grupo | n | Produção embrionária no dia 8 (%) | |
|---------|----------|-----|-----------------------------------|--------------------------------|
| | | | (média±desvio padrão) | |
| | | | Eclosão Embrionária ² | Total de Embriões ¹ |
| 1 - MIV | Controle | 181 | 42,24±32,93 ^a | 25,73±11,59 ^a |
| | Ala-gln | 186 | 58,34±13,64 ^a | 36,41±5,11 ^b |
| 2 - MIV | Controle | 285 | 67,42±21,02 ^a | 26,30±13,53 ^a |
| | Gli-gln | 339 | 76,05±21,17 ^a | 31,98±9,76 ^a |

Letras diferentes na coluna entre os tratamentos de cada experimento indicam diferença estatística ($p<0,05$).

n: número de zigotos em d1; Ex: Experimento; ¹Taxa do total de embriões calculada pelo número de zigotos (n); ²Taxa de eclosão embrionária calculada pelo número total de embriões no dia 7 (tabela 2) de cultivo *in vitro*.

A maturação *in vitro* envolve dois processos, a maturação nuclear e a citoplasmática. A maturação nuclear consiste na retomada e progressão da meiose até o estágio de metáfase II (MII) da meiose II e a extrusão do primeiro corpúsculo polar. A maturação citoplasmática é um processo de difícil avaliação, consiste na reorganização das organelas citoplasmáticas e na síntese de mRNA (Kim et al., 2013). A ocorrência dos dois processos de maturação, nuclear e citoplasmático, permite ao oócito que, quando fecundado, tenha potencial para o desenvolvimento embrionário, sendo a produção de blastocistos um fator fidedigno de avaliação indireta da maturação oocitária.

Com os resultados encontrados, sugere-se que ocorreram alterações nas atividades metabólicas de oócitos e embriões. O crescimento embrionário *in vitro* foi maior no estágio de blastocisto, com conseqüente aumento da produção total de embriões em d7 e d8 na presença do Ala-gln na MIV; assim, levantou-se a hipótese de um crescimento mais homogêneo dos embriões do sexo feminino em relação ao sexo masculino ou um aumento da competência de oócitos. A proporção de sexos na produção de embriões é diretamente afetada na presença de glutamina, uma vez que seu metabolismo aumenta em aproximadamente um terço a atividade da via da pentose-fosfato, ligada ao cromossomo X (Tiffin et al., 1991). A utilização do dipeptídeo poderia estar alterando a velocidade na qual a via é catalisada pela enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD), desacelerando a captação de glicose em embriões do sexo feminino e permitindo um desenvolvimento mais acelerado, uma vez que na presença de glutamina ocorre o inverso (Rieger et al., 1992b).

O efeito observado na MIV dos oócitos bovinos tratados com Ala-gln está relacionado ao encontrado por Tareq et al. (2013), com incremento do número de oócitos suínos que atingiram a fase de MII, divergindo de Kim et al. (2013) que não encontraram diferenças na taxa de oócitos suínos que atingiram a MII, mas sugere que o efeito do Ala-gln esteja relacionado ao desenvolvimento do zigoto após a transição materno zigótica. Ambos os autores concordam, encontrando maior número de embriões no estágio de blastocisto quando Ala-gln foi aplicado no meio MIV em suínos, quando comparado ao grupo controle, como encontrado para bovinos neste estudo. A redução do amoníaco poderia explicar os resultados encontrados no experimento 1,

uma vez que, conforme proposto por Yuan e Krisher (2010), a produção de amoníaco na MIV teria efeitos prejudiciais à maturação nuclear, bem como o aumento da captação de glicose observado em embriões suínos (Tareq et al., 2013).

Moraveck et al. (2012) sugerem que os dipeptídeos teriam mecanismos específicos de transporte celular, que associados à menor afinidade do Gli-gln pela peptidase (Christie e Butler, 1994), responsável por realizar a hidrólise extracelular destas moléculas, poderiam explicar os resultados do experimento 2, necessitando avaliar maiores concentrações do Gli-gln na MIV.

As tabelas 4 e 5 apresentam as médias e desvio padrão em todos os estágios embrionários e a média do total de embriões dos experimentos para os dias 7 e 8 de CIV, respectivamente, para os experimentos 3, 4 e 5 utilizando os dipeptídeos na etapa de CIV.

Os dados da aplicação de dipeptídeos no CIV mostram que, quando associados, os dipeptídeos substituindo a glutamina, alanina e glicina por peso molar equivalente (experimento 3) não apresentam efeitos sobre os parâmetros de desenvolvimento embrionário avaliados, não havendo diferença estatística ($p>0,05$) em relação ao controle utilizando os aminoácidos isolados (tabelas 4 e 5). No experimento 4, no entanto, utilizando associadamente Ala-gln (0,6mM) e Gli-gln (2 mM), observou-se a redução ($p<0,05$) em relação ao controle no estágio de blastocisto expandido e no total de embriões em d7 (Tabela 4) e da eclosão embrionária em d8 (Tabela 5).

O experimento 5, quando os dipeptídeos foram aplicados separadamente nas concentrações calculadas pelo peso molar equivalente da substituição, não foram observadas diferenças ($p>0,05$) entre os grupos para os estágios de blastocisto e blastocisto expandido em d7. Os grupos tratados apresentaram menor média ($p<0,05$) de blastocistos eclodidos em d7 em relação ao controle (Tabela 4). A produção embrionária total em d7 e d8 foi menor ($p<0,05$) nos grupos tratados em relação ao grupo controle (Tabela 4 e 5). O grupo Gli-gln+alanina diferiu do controle e do Ala-gln+glicina na eclosão embrionária em d8 (Tabela 5).

Tabela 4: Porcentagem (%) média e desvio padrão para produção embrionária no dia 7 (d7) de cultivo *in vitro*, nos estágios de blastocistos, blastocistos expandidos, blastocistos eclodidos e total de embriões bovinos utilizando dipeptídeos no CIV.

| Ex | Grupo | n | Produção embrionária no dia 7 (%) | | | |
|--------|---------------------------------|-----|-----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| | | | (média±desvio padrão) | | | |
| | | | Blastocistos ¹ | Blastocistos Expandidos ¹ | Blastocistos Eclodidos ¹ | Total de Embriões ¹ |
| 3- CIV | Controle | 245 | 20,01±8,04 ^a | 9,63±5,65 ^a | 1,2±1,93 ^a | 30,84±9,96 ^a |
| | Ala-gln e Gli-gln | 317 | 19,24±12,03 ^a | 7,52±6,71 ^a | 0,3±1,1 ^a | 27,07±13,96 ^a |
| 4- CIV | Controle | 357 | 16,72±9,89 ^a | 10,02±5,93 ^b | 1,71±4,35 ^a | 28,46±13,7 ^b |
| | Ala-gln (0,6mM) e Gli-gln (2mM) | 352 | 12,28±6,79 ^a | 4,04±4,75 ^a | 0,59±2,22 ^a | 16,92±9,14 ^a |
| 5- CIV | Controle | 179 | 24,49±9,14 ^a | 4,99±4,31 ^a | 5,05±3,06 ^b | 34,54±7,72 ^b |
| | Ala-gln e glicina | 188 | 17,55±5,08 ^a | 3,68±5,23 ^a | 0,52±1,39 ^a | 21,77±7,68 ^a |
| | Gli-gln e alanina | 161 | 17,45±5,66 ^a | 6,24±3,17 ^a | 1,25±1,94 ^a | 24,95±6,02 ^a |

Letras diferentes na coluna entre os tratamentos de cada experimento indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

n: número de zigotos em d1; Ex: Experimento; ¹Taxa de diferentes estágios embrionários e total de embriões calculada pelo número de zigotos (n).

Tabela 5: Porcentagem (%) média e desvio padrão para eclosão embrionária e total de embriões no dia 8 (d8) de cultivo *in vitro* utilizando dipeptídeos no CIV.

| Ex | Grupo | n | Produção embrionária no dia 8 (%) | |
|--------|---------------------------------|-----|-----------------------------------|--------------------------------|
| | | | (média±desvio padrão) | |
| | | | Eclosão Embrionária ² | Total de Embriões ¹ |
| 3- CIV | Controle | 245 | 54,88±19,79 ^a | 36,15±14,12 ^a |
| | Ala-gln e Gli-gln | 317 | 43,44±35,87 ^a | 28,09±15,05 ^a |
| 4- CIV | Controle | 357 | 55,93±13,26 ^b | 34,3±14,9 ^a |
| | Ala-gln (0,6mM) e Gli-gln (2mM) | 352 | 32,21±30,21 ^a | 28,91±14,21 ^a |
| 5- CIV | Controle | 179 | 62,80±11,61 ^b | 41,23±11,59 ^b |
| | Ala-gln e glicina | 188 | 62,48±23,52 ^b | 29,20±6,28 ^a |
| | Gli-gln e alanina | 161 | 23,01±11,74 ^a | 23,58±5,61 ^a |

Letras diferentes na coluna entre os tratamentos de cada experimento indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

n: número de zigotos em d1; Ex: Experimento; ¹Taxa do total de embriões calculada pelo número de zigotos (n); ²Taxa de eclosão embrionária calculada pelo número total de embriões no dia 7 (tabela 2) de cultivo *in vitro*.

Os dados do experimento 3 e 4, divergem do observado em suínos, onde a associação dos dipeptídeos no CIV incrementou a taxa de blastocisto, reduziu a concentração de amoníaco e aumentou a contagem total de células (Tareq et al., 2013). A competitividade entre os canais de transporte nas células, sugerida por Moraveck et al. (2012), poderiam explicar estes resultados, principalmente se os mecanismos de transporte celular forem os mesmos.

Os dados também não corroboram com a hipótese levantada por Hagemann et al. (1998) que, após não encontrarem diferença ($p > 0,05$) na produção *in vitro* de embriões bovinos utilizando um meio comercial, GlutaMax-II®, composto de Gli-gln, sugeriram que a associação de Ala-gln e Gli-gln poderia melhorar a produção embrionária.

Kim et al. (2013) observaram no CIV de embriões suínos que o Ala-gln, quando aplicado no CIV, não diferiu dos valores de produção total de embriões do grupo controle utilizando glutamina, divergindo deste estudo. Apesar da menor produção total de embriões em d7 e d8 do grupo Ala-gln+glicina, o resultado semelhante ($p > 0,05$)

encontrado na eclosão embrionária de Ala-gln+glicina e do grupo controle pode estar relacionado a atividade osmorreguladora da glicina, auxiliando na formação da blastocela e expansão do blastócito (Leese et al., 1993). O Gli-gln foi associado ao melhor desenvolvimento em embriões de rato (Biggers et al., 2004a; Summers et al., 2005; Moraveck et al., 2012) e de suínos (Tareq et al., 2013), onde os autores observaram que, quando aplicados Ala-gln e Gli-gln no CIV separadamente, ambos os dipeptídeos apresentaram aumento ($p < 0,05$) da taxa de blastocisto, divergindo dos dados encontrados no experimento 5, onde a utilização do Gli-gln+alanina reduziu a produção e eclosão embrionária.

Na avaliação do desenvolvimento embrionário foram considerados embriões os estágios de blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido. Na avaliação embrionária, diferentes períodos e estágios embrionários podem ser utilizados de acordo com a proposta do estudo. Neste experimento, os parâmetros avaliados para cinética de desenvolvimento embrionário (Tabelas 2, 3, 4 e 5) apresentam valores semelhantes ao encontrado por outros autores utilizando a mesma metodologia (Tiffin et al., 1991; Hagemann et al., 1998), e discordam de valores como os apresentados por Moore e Bondioli (1993) uma vez que os autores contabilizaram mórulas na taxa final de embriões.

Na taxa de eclosão embrionária (Tabela 3 e 5), os valores são semelhantes aos encontrados por outros autores em embriões bovinos (Tiffin et al., 1991; Zhang et al., 1995; Hagemann et al., 1998).

3.3.3 Qualidade embrionária

Os dados da avaliação de qualidade embrionária são apresentados na tabela 6 para todos os experimentos realizados.

Não se observou diferença ($p > 0,05$) do grupo tratado em relação ao controle nos experimentos 1 e 2, quando os dipeptídeos foram utilizados na MIV.

Quando associados no CIV, independente da concentração (experimentos 3 e 4), os dipeptídeos Ala-gln e Gli-gln levam à redução ($p < 0,05$) da contagem total de células. Quando aplicados isoladamente (experimento 5) no CIV, os grupos Ala-gln+glicina e Gli-gln+alanina não diferem ($p > 0,05$) do grupo controle.

Tabela 6: Média e desvio padrão para contagem total de células de embriões eclodidos no dia 8 (d8) de cultivo *in vitro*.

| Experimento | Grupo | n | Contagem total de células |
|-------------|---------------------------------|----|---------------------------|
| | | | (média±desvio padrão) |
| 1 - MIV | Controle | 21 | 277,28±51,22 ^a |
| | Ala-gln | 30 | 259,9±66,89 ^a |
| 2 - MIV | Controle | 32 | 245,56±66,13 ^a |
| | Gli-gln | 52 | 224,63±63,49 ^a |
| 3 - CIV | Controle | 35 | 190,42±51,25 ^b |
| | Ala-gln e Gli-gln | 28 | 146,82±28,05 ^a |
| 4 - CIV | Controle | 52 | 237,05±64,10 ^b |
| | Ala-gln (0,6mM) e Gli-gln (2mM) | 22 | 162,22±45,16 ^a |
| 5 - CIV | Controle | 35 | 224,22±51,72 ^a |
| | Ala-gln e glicina | 26 | 213,0±44,49 ^a |
| | Gli-gln e alanina | 9 | 207,11±70,94 ^a |

Letras diferentes na coluna entre os tratamentos de cada experimento indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

n: número de embriões no estágio de blastocisto eclodido com contagem total de células.

A associação dos dipeptídeos no CIV foi prejudicial à qualidade embrionária, reduzindo o número de células em d8. Segundo Moraveck et al. (2012), o mecanismo de transporte celular e a competitividade pela peptidase podem ser fatores a influenciar na utilização dos dipeptídeos associados, uma vez que se desconhece estes mecanismos. Os autores ainda levantam a hipótese de que os mecanismos de transporte poderiam ser diferentes de acordo com a espécie e estágio de desenvolvimento embrionário.

Os dados de contagem de células do experimento 3 e 4 divergem do observado em suínos, onde a associação dos dipeptídeos no CIV aumentou a contagem total de células (Tareq et al., 2013).

Assim como para produção embrionária, os dados apresentados mostram que a associação dos dipeptídeos reduziu ($p < 0,05$) a contagem total de células, não corroborando com a hipótese levantada por Hagemann et al. (1998) de uma possível melhora na qualidade embrionária.

Tareq et al. (2013) observaram que, quando aplicados Ala-gln e Gli-gln no CIV separadamente, ambos os dipeptídeos apresentaram aumento ($p < 0,05$) da contagem total de células em relação ao controle; no entanto, os dados do experimento 5 mostram que no cultivo de embriões bovinos não houve diferença em relação ao controle.

3.4 CONCLUSÃO

A substituição da glutamina por Ala-gln no meio MIV aumentou a taxa de blastocistos em d7 e o total de embriões produzidos em d7 e d8, sem alteração na contagem total de células.

Não houve alteração em nenhum dos parâmetros avaliados quando Gli-gln foi utilizado na MIV.

A utilização dos dipeptídeos Ala-gln e Gli-gln associados em meio CIV reduziu a taxa de blastocistos expandidos em d7 e de eclosão embrionária em d8 em concentrações maiores, e a contagem total de células independente da concentração utilizada.

Quando os dipeptídeos foram aplicados separadamente no CIV adicionados de alanina e/ou glicina, reduziram a produção embrionária em d7 e d8, e eclosão embrionária para Gli-gln adicionado de alanina, não havendo diferenças na qualidade embrionária.

CAPÍTULO 4

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Brasil demonstra a importância da PIVE por sua liderança mundial na produção de embriões *in vitro* e, principalmente, por estar entre os maiores produtores mundiais de carne e leite, bem como entre os maiores exportadores de produtos pecuários. Sendo referência, é importante que constantes avanços e contribuições científicas sejam gerados, agregando ao país maior visibilidade frente a outros países em um dos marcos históricos de nossa produção científica na área de biotecnologia da reprodução animal.

Pode-se observar ao longo da revisão e dos dados apresentados que a aplicação de dipeptídeos é bem sucedida na produção *in vitro* de embriões bovinos, bem como de outras diversas espécies, necessitando, porém, estudos que gerem contribuições quanto às modificações metabólicas ocorridas na presença de dipeptídeos.

Os dados dos experimentos mostram um aumento na produção de embriões *in vitro*, maior que 10%, quando Ala-gln foi utilizado na MIV. Estes dados sustentam a hipótese de que a utilização dos dipeptídeos em substituição aos aminoácidos glutamina, alanina e glicina melhora a produção embrionária.

Os dados de qualidade embrionária mostram que, independente da etapa da PIVE, os dipeptídeos quando isolados não influenciam na qualidade dos embriões produzidos e, quando associados os dipeptídeos no CIV, como sugerido por Hagemann et al. (1998), prejudicam a qualidade embrionária, levando à queda da contagem de células embrionárias e, em maiores concentrações, à redução da eclosão embrionária *in vitro*. Os dados rejeitam a hipótese inicial de que os dipeptídeos melhoram a qualidade embrionária, mas levantam a hipótese de que a influência dos dipeptídeos esteja relacionada a melhor proporção de células da ICM e TE como observado em ratos.

Em trabalhos futuros, a hipótese de melhoria na competência oocitária e de desaceleração do crescimento embrionário será testada através da seleção de oócitos

pelo teste de azul cresil brilhante ligado à atividade da G6PD nos oócitos, respondendo quanto à conexão da atividade desta enzima na maturação dos oócitos e associada à sexagem dos embriões por PCR em tempo real para verificar a proporção de macho:fêmea.

Alguns autores sugerem a participação da glutamina sobre alterações no desenvolvimento fetal. Uma das características do dipeptídeo é a aceleração na atividade de degradação quando em presença de SFB; sendo assim, sugere-se teste com a redução ou total exclusão das concentrações de SFB, com a transferência dos embriões, com o objetivo de se estudar a redução dos efeitos teratogênicos observados em bezerros nascidos através da PIVE, utilizando meios de cultivo *in vitro* definido (na ausência de proteínas de origem animal) ou semi-definido (utilizando somente BSA).

A continuidade da proposta também prevê a utilização dos dipeptídeos na etapa de FIV, bem como nas fases de MIV, FIV e CIV associadamente.

Em relação à qualidade embrionária, sugere-se a utilização da técnica de diferenciação de ICM e TE, afim de se avaliar a proporção das células e determinar os efeitos dos dipeptídeos sobre a proporção ICM e TE.

REFERÊNCIAS

ASBIA – Associação Brasileira de Inseminação Artificial [Internet]. Index ASBIA – Importação, Exportação e comercialização de sêmen. 2014 [citado em 26 de Outubro 2014]. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/novo/relatorios/> .

Biggers JD, McGinnis LK, Lawitts JA. Enhanced effect of glycyl-L-glutamine on mouse preimplantation embryos in vitro. *Reproductive BioMedicine Online*. 2004a; 9: 59-69.

Biggers JD, McGinnis LK, Raffin M. Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium. *Biology of Reproduction*. 2000; 63: 281-293.

Biggers JD, McGinnis LK, Summers MC Discrepancies between the effects of glutamine in cultures of preimplantation mouse embryos. *Reproductive BioMedicine Online*. 2004b; 9: 70-73.

Binelli M, Portela VM, Murphy BD. Dinâmica ovariana e eficiência reprodutiva: Estado da arte. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2009; 6: 134-139.

Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tríbulo R, Tríbulo H, Mapletoft RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*. 2002; 57: 53-72.

Booth PJ, Humpherson PG, Watson TJ, Leese HJ. Amino acid depletion and appearance during porcine preimplantation embryo development in vitro. *Reproduction*. 2005; 130: 655-658.

Cagnone GLM, Dufort I, Vigneault C, Sirard MA. Differential gene expression profile in bovine blastocysts resulting from hyperglycemia exposure during early cleavage stages. *Biology of Reproduction*. 2012; 86: 1-12.

Carney EW, Bavister BD. Stimulatory and inhibitory effects of amino acids on the development of hamster eight-cell embryos in vitro. *Journal In vitro. Fertilisation and Embryo Transfer*. 1987, 4:162-167.

Chatot CL, Tasca RJ, Ziomek CA. Glutamine uptake and utilization by preimplantation mouse embryos in CZB medium. *Journal Reproduction and Fertility*. 1990; 89: 335-346.

Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *Journal Reproduction and Fertility*. 1989; 86: 679-688.

Christie A, Butler M. Glutamine-based dipeptides are utilized in mammalian cell culture by extracellular hydrolysis catalyzed by a specific peptidase. *Journal of Biotechnology*. 1994; 37: 277-290.

Devreker F, Hardy K, Van den Bergh M, Vannin AS, Emiliani S, Englert Y. Amino acids promote human blastocyst development in vitro. *Human Reproduction*. 2001; 16: 749-756.

Devreker MDF, Robert ML, Winston RML, Hardy K. Glutamine improves human preimplantation development in vitro. *Fertility and Sterility*. 1998; 69: 293-299.

Donnay I, Langendonck AV, Grisart AB, Vansteenbrugge A, Massip A, Dessy F. Effects of co-culture and embryo number on the in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology*. 1997; 47: 1549-1561.

Eagle H. Utilization of dipeptides by mammalian cell in tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1955; 89: 96-99.

Enright BP, Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Ward FA, Yang X, Boland MP. Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: Implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*. 2000; 54: 659-673.

Fujiwara H, Higuchi T, Sato Y, Nishioka Y, Zeng B, Yoshioka S, Tatsumi K, Ueda M, Maeda M. Regulation of human extravillous trophoblast function by membrane-bound peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005; 1751: 26-32.

Fujiwara H. Membrane-bound peptidases regulate human extravillous trophoblast invasion. *Placenta*. 2007; 21: S70-S75.

Gardner DK, Lane M. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biology of Reproduction*. 1993; 48: 377-385.

Gardner DK, Lane M. Alleviation of the '2-cell block' and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Human Reproduction*. 1996; 11: 2703-2712.

Gonçalves PBD, Barreta MH, Sandri LR, Ferreira R, Antoniazzi, AQ. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2007; 31: 212-217.

Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y, Ogawa K. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. *Journal Reproduction and Fertility*. 1988; 83: 753-758.

Hagemann LJ, Weilert LL, Beaumont SE, Tervit R. Development of bovine Embryos in Single In vitro production (sIVP) systems. *Molecular Reproduction and Development*. 1998; 51: 143-147.

Hammer MA, Kolajova M, Léveillé MC, Claman P, Baltz JM. Glycine transport by single human and mouse embryos. *Human Reproduction*. 2000; 2: 419-426.

Hashimoto S, Nishihara T, Murata Y, Oku H, Nakaoka Y, Fukuda A, Morimoto Y. Medium without ammonium accumulation supports the developmental competence of human embryos. *Journal of reproduction and development*. 2008; 54: 370-374.

Houghton FD, Hawkhead JÁ, Humpherson PG, Hogg JE, Balen AH, Rutherford AJ, Leese HJ. Non-invasive amino acid turnover predicts human developmental capacity. *Human Reproduction*. 2002; 17: 999-1005.

Humpherson PG, Leese HJ, Sturmey RG. Amino acids metabolism of the porcine blastocyst. *Theriogenology*. 2005; 64: 1852-1866.

IETS - International Embryo Transfer Society. 2012 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newsletter – IETS*. 2013, 31: 24-46.

Iwasaki S, Yoshida N, Ushimijima H, Watanabe S, Nakahara T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1990; 90: 279-284.

Kim SJ, Koo OJ, Kwon DK, Kang JT, Park SJ, Gomez MN, Atikuzzaman M, Jang G, Lee B-C. Replacement of glutamine with the dipeptide derivative alanyl-glutamine enhances in vitro maturation of porcine oocytes and development of embryos. *Zygote*. 2013; 22: 286-289.

Lane M, Gardner DK. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1997a; 109: 153–164.

Lane M, Gardner DK. Non essential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes in vitro. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 1997b; 14:398–403.

Lane M, Gardner DK. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Human Reproduction*. 1998; 13: 991-997.

Lane M, Gardner DK. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biology of Reproduction*. 2003; 69: 1109-1117.

Lane M, Gardner DK. Embryo culture medium: which is the best?. *Best Practice e Research Clinical Obstetrics Gynaecology*. 2007; 21: 83-100.

Lee ES, Fukui Y. Synergistic effect of alanine and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by in vitro-produced bovine morulae and blastocysts. *Biology of reproduction*. 1996; 55: 1383-1389.

Leese HJ, Barton AM. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1984; 72: 9-13.

Leese HJ, Conaghan J, Martin KL, Hardy K. Early human embryo metabolism. *Bioessays*. 1993; 15: 259-264.

Leeuw AMW, Aerts, BJG, Daas JHG. Abnormal offspring following *in vitro* production of bovine preimplantation embryos: A field study. *Theriogenology*. 1998; 49: 883-894.

Li R, Wen L, Wang S, Bou S. Development, freezability and amino acid consumption of bovine embryos cultured in synthetic oviductal fluid (SOF) medium containing amino acids at oviductal or uterine-fluid concentrations. *Theriogenology*. 2006; 66: 404-414.

Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Molecular Reproduction and Development*. 1994; 37: 48-53.

Marinho LSR, Untura RM, Morotti F, Moino LL, Rigo AG, Sanches BV, Pontes JHF, Seneda MM. Large-scale programs for recipients of in vitro-produced embryos. *Animal Reproduction*. 2012; 9:323-328.

Martins GHL. Efeito da estimulação ovariana com o uso de FSH sobre a taxa de recuperação ovocitária e produção in vitro de embriões da raça Sindi (Dissertação de Mestrado). Brasília, DF: Universidade de Brasília; 2014.

Meyen BA, Rosenkrans CF, Davis DL. Development of pig blastocysts in vitro is altered by serum, bovine serum albumin and amino acids and vitamins. *Theriogenology*. 1989; 31: 463-471.

Mito T, Yoshioka K, Yamashita S, Suzuki C, Noguchi M, Hoshi H. Glucose and glycine synergistically enhance the in vitro development of porcine blastocysts in a chemically defined medium. *Reproduction, Fertility and Development*. 2011; 24: 443-450.

Moore K, Bondioli KR. Glycine and alanine supplementation of culture medium enhances development of in vitro matured and fertilized cattle embryos. *Biology of Reproduction*. 1993; 48:833-840.

Moraveck M, Fisseha S, Swain JE. Dipeptide forms of glycine support mouse preimplantation embryo development in vitro and provide protection agins high media osmalality. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2012; 29: 283–290.

Nakao H, Nakatsuji N. Effects of co-culture, medium components and gas phase on in vitro culture of in vitro matured and in vitro fertilized bovine embryos. *Theriogenology*. 1990; 33: 591-600.

Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Ed. Artmed, Porto Alegre, 2011.

Orsi NM, Leese HJ. Amino acid metabolism of preimplantation bovine embryos cultured with bovine serum albumin or polyvinyl alcohol. *Theriogenology*. 2004; 61: 561-572.

Partridge RJ, Leese HJ. Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos. *Reproduction, Fertility and Development*. 1996; 8:945–950.

Petters RM, Johnson BH, Reed ML, Archibong AE. Glucose, glutamine and inorganic phosphate in early development of the pig embryo in vitro. *Journal Reproduction and Fertility*. 1990; 89: 269-275.

Pontes JHF, Silva KCF, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GMG, Sanches BV, Porcionato JPF, Vieira PHS, Faifer FS, Sterza FAM, Schenk JL, Seneda MM. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*. 2010, 74:1349-1355.

Rieger D, Loskutoff NM, Betteridge KJ. Developmentally related changes in the uptake and metabolism of glucose, glutamine and pyruvate by cattle embryos produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*. 1992a; 4: 547-557.

Rieger D, Loskutoff NM, Betteridge KJ. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured in vitro. *Journal Reproduction and Fertility*. 1992b; 95: 585-595.

Rieger D. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenology*. 1992; 37: 75-93.

Rosenkrans Jr CF, First NL. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. *Journal Animal Science*. 1994; 72: 434-437.

Roth E, Ollenschlager G, Hamilton G, Simmel A, Langer K, Fekl W, Jakesz R. Influence of two glutamine-containing dipeptides on growth of mammalian cells. *In Vitro Cellular e Developmental Biology*. 1988; 24: 696-698.

Sinawat S, Hsaio W, Flockhart JH, Kaufman MH, Keith J, West JD. Fetal abnormalities produced after preimplantation exposure of mouse embryos to ammonium chloride. *Human Reproduction*. 2003; 18: 2157-2165.

Spell AR, Beal WE, Corah LR, Lamb GC. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*. 2001; 56: 287-297.

Steeves TE, Gardner DK. Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. *Biology of Reproduction*. 1999, 61: 731-740.

Stevanato J. Análise da variação da concentração de amônia, dos aminoácidos alanina e glutamina e do dipeptídeos alanil-glutamina no meio de cultura de embriões humanos e os efeitos na reprodução (Tese de Doutorado). São Paulo, SP: Universidade Federal de São Paulo; 2009.

Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, Wolfi E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: Correlation with morphological criteria and

development capacity after in vitro fertilization and culture. *Biology of Reproduction*. 2001; 64: 904-909.

Summers MC, McGinnis LKM, Lawitts JA, Biggers JD. Mouse embryo development following IVF in media containing either L-glutamine or glycyl-L-glutamine. *Human Reproduction*. 2005; 20: 1364-1371.

Swain JE, Bormann CL, Clark SG, Walters EM, Wheller MB, Krisher RL. Use of energy substrates by various stage preimplantation pig embryos produced in vivo and in vitro. *Reproduction*. 2002; 123: 253-260.

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

Tareq KMA, Akter QS, Tsujii H, Khandoker MAMY, Choi I. Effect of dipeptides on the in vitro maturation, fertilization and subsequent embryonic development of porcine oocytes. *Asian-Australians Journal of Animal Science*. 2013; 26: 501-508.

Tareq KMA, Hossain MDS, Akter QS, Sawada T, Afrose S, Hamano K, Tsujii H. Effect of amino acids and dipeptides on the acrosome reaction and accumulation of ammonia in porcine spermatozoa. *Reproductive Medicine and Biology*. 2008; 7: 123-131.

Tareq KMA, Miah AG, Salma U, Yoshida M, Tsujii H. Effect of amino acids and dipeptides on accumulation of ammonia in the medium during in vitro maturation and fertilization of porcine oocytes. *Reproductive Medicine and Biology*. 2007; 6: 165-170.

Tiffin GJ, Rieger D, Betteridge KJ, Yadav BR, King WA. Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1991; 93: 125–132.

Van der Valk J, Brunner D, De Smet K, Fex Svenningsen A, Honegge P, Knudsen LE, Lindl T, Norabeg J, Price A, Scarino ML, Gstraunthaler G. Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. *Toxicology in Vitro*. 2010; 24: 1053-1063.

Varago FC, Mendonça LF, Lagares MA. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectivas de uma técnica em constante evolução. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2008; 32: 100-109.

Viana JHM, Bols PEJ. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos cumulus-oócito por aspiração folicular. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2005, 33: 1-4.

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

Yuan Y, Krisher RL. Effect of ammonium during *in vitro* maturation on oocyte nuclear maturation and subsequent embryonic development in pigs. *Animal Reproduction Science*. 2010; 117:302-307.

Zhang L, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X, Godke R. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*. 1995; 40: 338-344.

ANEXO I – Classificação de oócitos

1) Classificação de oócitos (figura 1), segundo Stojkovic et al. (2001).

- Grau 1 – Complexo cumulus-oócito (COCs) com citoplasma homogêneo, células do cumulus circundando completamente a zona pelúcida (ZP), compactado e com múltiplas camadas.
- Grau 2 – COCs com citoplasma homogêneo, poucas áreas de pigmentação irregular, cumulus menor que o grau 1, mas com mais de cinco camadas de células compactadas de cumulus circundando completamente a ZP.
- Grau 3 – COCs com citoplasma heterogêneo, vacuolizado, com três a cinco camadas de células do cumulus circundando a ZP, exceto por pequenas áreas sem cobertura de cumulus.
- Grau 4 – COCs com citoplasma heterogêneo, pigmentado, com cumulus totalmente ou em grande parte ausente ou expandido.

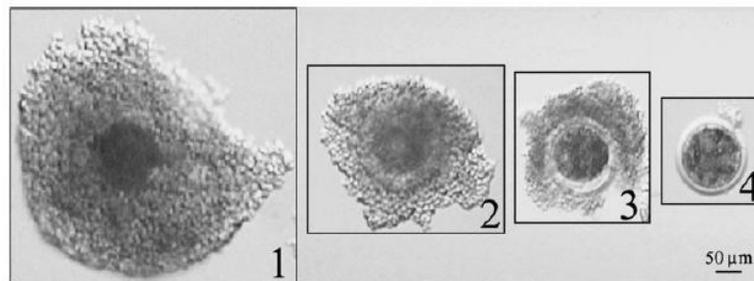


FIG. 1. Four categories of bovine COCs evaluated according to the morphological appearance of cytoplasm and cumulus cells (more details in *Materials and Methods*).

(Fonte: Stojkovic et al., 2001).

ANEXO II – Estágios embrionários

Morfologia dos estágios embrionários (figura 2) avaliados no dia 7 (D7) de cultivo *in vitro*, correspondentes a soma total de embriões no D7 e D8.

- a) Blastocisto – Embrião com primeira diferenciação celular (trofoblasto e massa celular interna), formação da blastocele, presença de botão embrionário, sem expansão da blastocele, zona pelúcida íntegra.
- b) Blastocisto expandido - Conformação do blastocisto com expansão da blastocele e zona pelúcida delgada, porém íntegra.
- c) Blastocisto eclodido - Conformação de blastocisto, com rompimento da zona pelúcida e extrusão parcial ou completa do embrião para fora da zona pelúcida.

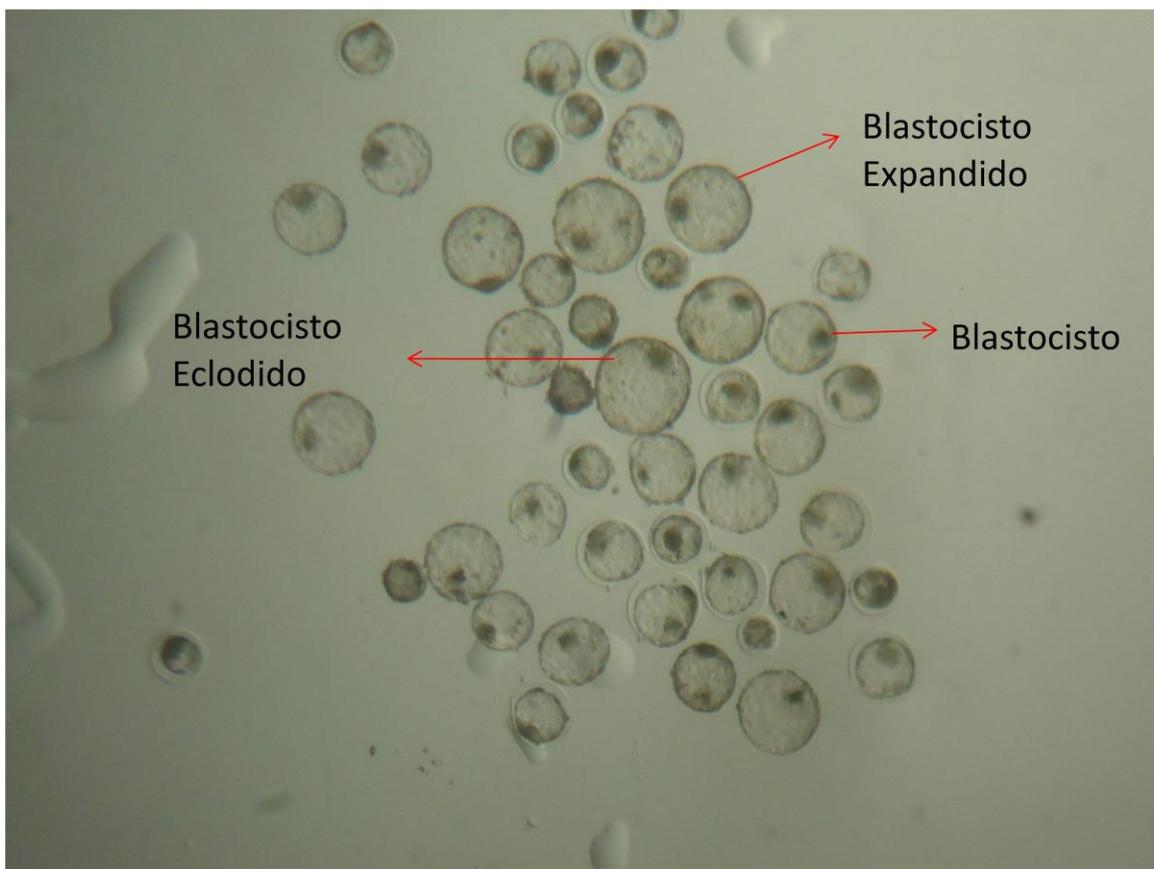


Figura 2: Estágios embrionários blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido, observados no dia 7 (D7) e 8 (D8) de cultivo *in vitro* (CIV).