



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

**USO DO FSH RECOMBINANTE HUMANO NA PRODUÇÃO IN VITRO
DE EMBRIÕES BOVINOS**

Letícia Prates Martins

**BRASÍLIA, DF
2022**

LETÍCIA PRATES MARTINS

**USO DO FSH RECOMBINANTE HUMANO NA PRODUÇÃO IN VITRO
DE EMBRIÕES BOVINOS**

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

Orientador: Dr. João Henrique Moreira Viana

BRASÍLIA, DF

2022

LETÍCIA PRATES MARTINS

**USO DO FSH RECOMBINANTE HUMANO DA PRODUÇÃO IN VITRO
DE EMBRIÕES BOVINOS**

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

Aprovada em: 15/07/2022

Banca examinadora:

Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana (Presidente)

Profa. Dra. Margot Alves Nunes Dode (Membro Titular)

Dr. João Gabriel Viana de Grázia (Membro Titular)

Suplente:

Dr. Ricardo Alamino Figueiredo

BRASÍLIA, DF

2022

À minha família, em especial, aos meus amados avós Ademilson Barbosa Martins e Maria de Lourdes Costa Martins. Aos que estão em nossos corações, Neuzina Maria Prates e Paulo César Dias Prates. Também dedico a minha amada mãe Léa Márcia Prates Martins, e ao meu querido irmão, Caio César Prates Martins.

“E sabemos que todas as coisas contribuem juntamente para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito”.

Romanos 8.28

AGRADECIMENTOS

Obrigada, meu Deus, pois o Senhor foi e sempre será a minha força e motivação dia após dia.

Obrigada família, mesmo de longe, vocês foram a minha base, minha fortaleza, sem vocês eu não teria conseguido. Muito obrigada por tudo!

Agradeço ao Otávio Faria e família, obrigada por me acolherem de forma tão amorosa em Brasília e por não deixarem, nem por um dia, que eu me sentisse sozinha.

Aos amigos queridos de Alta Floresta, Luany, Ismael e Dhonata e Felipe. Com a ajuda de vocês, realizar cada etapa do processo se tornou leve, foram dias de muito aprendizado e troca de experiência, muito obrigada por tudo.

João Gabriel, nunca conseguirei demonstrar tamanha gratidão por tudo que você fez para este projeto. Obrigada por abrir as portas do laboratório, disponibilizar seu tempo, conhecimento e todo material para as produções in vitro. Com você aprendi a trabalhar, meu crescimento profissional foi indescritível. Muito obrigada!

Minha imensa gratidão ao Dr. Ricardo Alamino, muito obrigada por me dar a oportunidade de entrar no mestrado, principalmente na Embrapa.

Impossível não agradecer a Embrapa (Fazenda Sucupira e Cenargen), sou imensamente grata por todas as oportunidades que tive lá dentro, agradeço até mesmo por todas as dificuldades vividas durante minha estadia no alojamento, mas, principalmente, agradeço aos funcionários, em nome da Rosângela, pois são vocês que fazem tudo acontecer, muito obrigada por tudo!

Dr. João Henrique, muitíssimo obrigada por confiar a mim essa oportunidade. O que era para ser apenas um teste se tornou esse projeto, no qual tenho tanto orgulho. Tudo isso só foi possível graças ao senhor! Obrigada por ter sido tão humano e gentil durante todo o processo. Muito obrigada por me ensinar o que é ser uma aluna da pós-graduação, obrigada pela paciência e por todos os ensinamentos.

ÍNDICE

Capítulos/subcapítulos	página
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE ANEXOS	xviii
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO DE LITERATURA	1
1. INTRODUÇÃO GERAL	2
1.1 Objetivos	4
1.1.1 Objetivo Geral	4
1.1.2 Objetivo Específicos	4
1.2 HIPÓTESE	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
CAPÍTULO 2: Use of purified porcine FSH (pFSH) or follitropin-alpha (rhFSH) during <i>in vitro</i> maturation of Nelore breed (<i>Bos taurus indicus</i>) oocytes: effects on embryo production and developmental potential	21
ABSTRACT	22
1. INTRODUCTION	23
2. MATERIAL AND METHODS	24
2.1. EXPERIMENTAL DESIGN	24
2.2. OOCYTE RECOVERY AND IN VITRO EMBRYO PRODUCTION	26
2.3. VITRIFICATION AND THAWING	27
2.4. DIFFERENTIAL STAINING	28

2.5. EMBRYO TRANSFER	28
2.6. DATA ANALYSIS	29
5. RESULTS	29
3.1. EXPERIMENT 1	29
3.2. EXPERIMENT 2	30
3.3. EXPERIMENT 3	30
3.4. EXPERIMENT 4	30
6. DISCUSSION	31
REFERENCES	35
TABLES	41
FIGURE CAPTIONS	44
AGRADECIMENTOS	47
CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
ANEXOS	49
1. Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética	49
2. Resumos submetidos à congressos	50

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) de bovinos está em constante crescimento, e o desenvolvimento de novos protocolos é importante para a melhoria dos índices de produção, o que pode permitir o escalonamento da técnica. Dentre as etapas da PIVE, a maturação *in vitro* (MIV) é considerada essencial, pois ocorrem alterações no ovócito que permitem que a fecundação ocorra com sucesso e inicia-se o processo de desenvolvimento embrionário. *In vitro*, o FSH é necessário nas primeiras horas da MIV e, convencionalmente, os meios de maturação são suplementados com FSH de hipófise suína. Entretanto, esse extrato não possui uma padronização entre as partidas, possui contaminação de outros hormônios, como o LH, e encontra-se, atualmente, escasso no mercado. Em 1988 foi produzido o primeiro FSH recombinante humano. Através dessa tecnologia é possível produzir a molécula em grande escala, com alta pureza e sem variabilidade na composição. Existem algumas formulações de rhFSH disponíveis no mercado, como as folitropinas alfa, beta e delta. A folitropina alfa é utilizada na rotina clínica na reprodução humana desde 1995. Atualmente, essa molécula vem despertando interesse para uso na área animal, devido a sua padronização entre doses, pureza e meia vida mais prolongada. Nosso estudo avaliou o uso de FSH suíno (pFSH) ou folitropina-alfa (rhFSH), durante a maturação *in vitro* (MIV) de complexos cumulus-ovócitos (COC) recuperados de bovinos Nelore (*Bos taurus indicus*). Foram realizados quatro experimentos, todos usando CCO grau I (n = 11.245) submetidos a MIV em TCM199 sem FSH (-FSH) ou suplementados com 0,5 µg/mL de pFSH (Folltropin-V, Exp. 1 a 4) ou 0,1 UI rhFSH (Gonal-F, Exp. 2, 3 e 4). Foram feitas avaliações da expansão do cumulus, produção de blastocisto, criotolerância, contagem de células e taxa de prenhez. A expansão do cumulus foi maior ($P < 0,0001$) na presença de pFSH, independentemente da concentração de SFB. FSH e o SFB aumentaram as taxas de clivagem e blastocisto ($P < 0,05$), mas nenhuma interação entre eles foi observada ($P > 0,05$). No Exp. 2, CCO (n=2.791) foram maturados na ausência de FSH (-FSH) ou com pFSH ou rhFSH, e foram submetidos à PIVE. Blastocistos foram avaliados para eclosão como frescos ou após vitrificação e desvitrificação (ou reaquecimento). A expansão do cumulus e as taxas de blastocisto foram maiores ($P < 0,05$) nos grupos tratados com FSH (pFSH e

rhFSH) do que sem FSH (-FSH). No entanto, não houve efeito do tratamento ($P>0,05$) nas taxas de eclosão de blastocistos frescos ou vitrificados. No Exp. 3, CCO (n=720) foram maturados nos grupos -FSH, pFSH ou rhFSH, e os blastocistos expandidos produzidos foram corados com Hoechst 33342 e iodeto de propídio. Blastocistos do grupo rhFSH apresentaram mais células no trofoblasto ($P=0,0002$), mas não no MCI ($P=0,3231$), quando comparados aos grupos pFSH e -FSH. No Exp. 4, usamos o mesmo desenho experimental do Exp. 2 mas em uma rotina comercial de PIVE, que incluiu o uso de CCO recuperado por OPU e sêmen sexado de macho, e a transferência de parte dos blastocistos produzidos. Tanto o pFSH quanto o rhFSH aumentaram as taxas de clivagem ($P=0,0035$) e de blastocistos ($P=0,0102$), mas não a taxa de prenhez ($P=0,1080$), em comparação com -FSH. Em resumo, a folitropina-alfa é uma alternativa ao pFSH como suplemento para MIV de CCO bovino.

Palavras-chave: ovócito, maturação, Nelore, gonadotrofinas, blastocistos

ABSTRACT

Bovine *in vitro* embryo production (IVEP) is constantly growing, and the development of new protocols is important for the scaling up of the technique. Among the steps of IVEP, *in vitro* maturation (IVM) is considered a key point, changes occur in the oocyte that allow successful fertilization. *In vitro*, FSH is required in the first hours of IVM and, conventionally, the maturation media are supplemented with FSH from swine pituitary, however this extract does not have a standardization between the batches, it has contamination of other hormones, such as LH, and is currently scarce on the market. In 1988 the first human recombinant FSH was produced. Through this technology it is possible to produce the molecule on a large scale, with high purity and without variability in composition. There are some rhFSH formulations available on the market, such as follitropins alpha, beta and delta. Follitropin alfa has been used in clinical routine in human reproduction since 1995. Currently, this molecule is attracting interest for use in the animal area, due to its standardization between doses, purity and longer half-life. Our study complexes evaluated the use of porcine FSH (pFSH) or follitropin-alpha (rhFSH) during *in vitro* maturation (IVM) of cumulus-oocytes (COC) recovered from Nellore cattle (*Bos taurus indicus*). Four experiments were performed, all using grade I COC (n = 11,245) subjected to IVM in TCM199 without FSH (-FSH) or supplemented with 0.5 µg/mL pFSH (Folltropin-V, Exp. 1 to 4) or 0.1 IU rhFSH (Gonal-F, Exp. 2, 3 and 4). Cumulus expansion, blastocyst production, cryotolerance, cell count and pregnancy rate were evaluated. Cumulus expansion was greater (P<0.0001) in the presence of pFSH, regardless of FBS concentration. Both FSH and FBS increased cleavage and blastocyst rates (P<0.05), but no FSH x FBS interaction was observed (P>0.05). In Exp. 2, COC (n=2,791) were IVM in the absence of FSH (-FSH) or with pFSH or rhFSH, and underwent IVEP. Blastocysts were assessed for hatching as fresh or after vitrification and warming. Cumulus expansion and blastocyst rates were greater (P<0.05) in groups treated with (pFSH and rhFSH) than without FSH (-FSH). However, there was no effect of treatment (P>0.05) on hatching rates of fresh or vitrified blastocysts. In Exp. 3, COC (n=720) were IVM in groups -FSH, pFSH or rhFSH, and the expanded blastocysts produced were stained with Hoechst 33342 and propidium iodide. Blastocysts from the rhFSH group presented more cells in the trophoblast (P=0.0002), but not in the ICM (P=0.3231), when compared with pFSH and -FSH

groups. In Exp. 4, we used the same experimental design as in Exp. 2 but in a commercial IVEP routine, which included the use of COC recovered by OPU and Y-sorted semen, and the transfer of part of the blastocysts produced. Both pFSH and rhFSH increased cleavage ($P=0.0035$) and blastocyst rates ($P=0.0102$), but not pregnancy rate ($P=0.1080$), compared with -FSH. In summary, follitropin-alpha is an alternative to pFSH as a medium supplement for IVM of bovine COC.

Keywords: oocyte, maturation, Nelore, gonadotropins, embryos

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc – Adenosina 3,5-monofosfato cíclico
ARTs – Tecnologias de reprodução assistida
ATP – Adenina tri fosfato
BI – Blastocisto inicial
BL – Blastocisto
BN – Blastocisto em eclosão
BX – Blastocisto expandido
CCOs – Complexos cumulus-oophorus
CEUA – Comissão de Ética no Uso Animal
CIV – Cultivo *in vitro*
CHO – Ovário de hamster chinês
CL – Corpo lúteo
D10 – Décimo dia de cultivo *in vitro*
D3 – Terceiro dia de cultivo *in vitro*
D7 – Sétimo dia de cultivo *in vitro*
DT – Direct transfer
DVT – Desvitrificados
eCG – Gonadotrofina Coriônica Equina
ECP – Cipionato de Estradiol
FIV – Fecundação *in vitro*
FSH – Hormônio Folículo Estimulante
GVBD – Germinal Vesical Breackdown
H – Hoechst 33342
hCG – Gonadotrofina coriônica humana
hMG – Gonadotrofina menopáusica humana
IA – Inseminação Artificial
IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IP – Iodeto de Propídeo
LH – Hormônio Luteinizante
MII – Meiose II
MCI – Massa Celular Interna

MCI/Total – Proporção entre massa celular interna e número total de células

MIV – Maturação *in vitro*

MZT – Transição materno-zigótica

OPU – Aspiração folicular orientada por ultrassonografia transvaginal (Ovum pick-up)

PBS – Solução salina tamponada com fosfato (Phosphate buffered saline)

pFSH – Hormônio folículo estimulante de pituitária suína

PGF2 α – Prostaglandina F2-alfa

PKA – Proteína kinases A

PN – Pró-núcleo

PIVE – Produção *in vitro* de embriões

PVP - Polivinilpirrolidona

rhCG – Gonadotrofina coriônica humana recombinante

rhFSH – Hormônio folículo estimulante recombinante humano

rhLH – Gonadotrofina luteinizante humana recombinante

SFB – Soro Fetal Bovino

SOF – Fluido Sintético do Oviduto (Synthetic Oviductal Fluid)

TCM-199 – Meio de cultivo de tecidos (Tissue Culture Medium) 199

TE – Transferência de Embrião

VT – Vitrificados

ZP – Zona pelúcida

LISTA DE TABELAS

Número	Título	Página
	Capítulo 2: Use of purified porcine FSH (pFSH) or follitropin-alpha (rhFSH) during <i>in vitro</i> maturation of Nelore breed (<i>Bos taurus indicus</i>) oocytes: effects on embryo production and developmental potential	21
1	IVEP outcomes and subsequent hatching rates of fresh or vitrified blastocysts from bovine COC submitted to IVM in the absence (-FSH) or in the presence of porcine (pFSH) or recombinant human FSH (rhFSH).	41
2	Number of total, trophoblast and inner cell mass (ICM) cells, as well as the ICM/total ratio, in expanded blastocysts produced from bovine COC submitted to IVM in the absence (-FSH) or in the presence of porcine (pFSH) or recombinant human FSH (rhFSH).	42
3	IVEP outcomes and subsequent pregnancy rates of blastocysts produced from bovine COC submitted to IVM in the absence (-FSH) or in the presence of porcine (pFSH) or recombinant human FSH (rhFSH), and fertilized with Y-sorted semen.	43

LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Página
Capítulo 1: INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO DE LITERATURA		1
1	Número de embriões bovinos (produzidos <i>in vivo</i> [IVD], produzidos <i>in vitro</i> [IVP] e total) registrados no período 2001-2020. Fonte: Viana, 2019	5
2	Durante o desenvolvimento no ovário fetal, os ovócitos na maioria dos mamíferos param no estágio de diplóteno da prófase I (o estágio de vesícula germinativa). A retomada da meiose, desencadeada pela onda pré-ovulatória do hormônio luteinizante, e a progressão através da maturação resulta em parada adicional no estágio de metáfase II (MII) com extrusão do primeiro corpúsculo polar (PB) e estabelecimento de um complemento de DNA de 1n2C. A penetração do espermatozóide (1n1C) leva à extrusão do segundo PB e estabelecimento de um estado 1n1C no ovócito levando a um embrião diplóide (2n2C) após a primeira divisão mitótica após a fertilização. Todas as divisões subsequentes são mitóticas, resultando em duas células filhas idênticas. Abreviatura: PN, pronúcleos. Fonte: adaptado de Lonergan & Fair 2015.	8
Capítulo 2: Use of purified porcine FSH (pFSH) or follitropin-alpha (rhFSH) during <i>in vitro</i> maturation of Nelore breed (<i>Bos taurus indicus</i>) oocytes: effects on embryo production and developmental potential		21
1	A-D. Expansion of the cumulus cells in bovine COC after 22 h of IVM, according to group. A and B, COC submitted to IVM in the presence of 10% FBS; A and C, COC undergoing IVM in the presence of pFSH.	44
2	A-D. IVEP outcomes for bovine COC submitted to IVM in	45

	<p>the presence of either 10% or 1% FBS, and either without (-FSH) or with pFSH. A) Cleavage rate; B) Blastocyst rate at day 6 of IVC; C) Blastocyst rate at day 7 of IVC; D) Hatching rate at day 10 of IVC. P values for the effects of FHS (-FSH or pFSH), FBS (10% or 1%), and their interaction, are shown in the upper right side of each picture. ^{a,b,c}: P<0.05</p>	
3	<p>A-C. Expansion of the cumulus cells in bovine COC after 22 h of IVM, according to group. A) -FSH; B) pFSH; C) rhFSH.</p>	46

LISTA DE ANEXOS

Número	Título	Página
1	Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética	49
2	Resumos submetidos à congressos	50

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO DE LITERATURA

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil está entre os líderes mundiais na produção de carne e leite (ABIEC, 2019; USDA, 2019), e também de embriões bovinos produzidos *in vitro* (Viana, 2020). Além disso, o país possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, estimado em mais de 220 milhões de animais (ABIEC, 2019), sendo composto em sua grande maioria de animais da raça Nelore (Referência).

A eficiência reprodutiva é crítica na pecuária bovina e, considerando a crescente demanda mundial por proteína animal, novas estratégias de manejo e novas tecnologias para otimizar a eficiência reprodutiva podem aumentar a produtividade e a lucratividade (Cooke et al. 2019). Entre outros fatores, por acelerar o ganho genético dos rebanhos, tecnologias como a Inseminação Artificial (IA), Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), produção de Embriões por superovulação (SOV), Produção *in vitro* de Embriões (PIVE) e sexagem de sêmen, por exemplo, tem contribuído para aumentos expressivos na produção e produtividade da pecuária. Os avanços científicos e tecnológicos alcançados durante as últimas décadas na reprodução animal resultaram no desenvolvimento dessas ferramentas, comumente referidas como tecnologias de reprodução assistida (ARTs) (Berglund, 2008). Essas tecnologias têm como foco maximizar o número de descendentes de animais, tanto machos quanto fêmeas, geneticamente superiores, e contribuíram para disseminar essa genética nos rebanhos comerciais. Além disso, com as ARTs foram possíveis a proteção do germoplasma de espécies ameaçadas de extinção e o uso de animais subférteis ou com limitações anatômicas (Ferré et al. 2019).

Nos últimos anos, a transferência de embriões derivados da PIVE cresceu e, em 2016, o número de transferências de embriões gerados *in vitro* ultrapassou o de embriões coletados *in vivo* (Viana, 2020). Essa mudança é um retrato do aumento da eficiência dos procedimentos da técnica. Além disso, novas ferramentas de seleção genômica levaram a uma melhor escolha dos animais e uma aceleração do ganho genético (Gonzalez-Marin et al. 2017; Goddard et al. 2010). Contudo, a eficiência da PIVE está estável, obtendo-se uma produção média de 30% de blastocistos (Ferré et al. 2019). Pesquisas (Amaral et al. 2022, Kussano et al. 2021, Faria et al. 2021) buscam melhorar o desempenho geral da técnica com estudos nas

diferentes etapas do processo, como na estimulação ovariana, na maturação ovocitária, na fecundação e no cultivo embrionário.

Dentre as diferentes etapas do processo, a MIV merece atenção por se destacar como uma importante etapa para o sucesso da técnica (referência). Dessa forma, a maturação *in vitro* tem papel importante nas taxas de desenvolvimento dos blastocistos. A maturação do ovócito inclui alterações nucleares e citoplasmáticas que permitem que a fecundação ocorra com sucesso. *In vitro*, os ovócitos normalmente completam a maturação nuclear para meiose II (MII) dentro de 20 a 24 horas. Paralelamente, os ovócitos também completam a maturação citoplasmática (Hyttel et al. 1986). Cerca de 85% a 90% dos ovócitos imaturos cultivados atingem MII ao fim da MIV. Por mais que essa taxa seja relativamente alta, a maturação citoplasmática e a aquisição de competência não acompanham, em muitos casos, a maturação nuclear, podendo ser responsáveis por deficiências na fecundação e posterior desenvolvimento (Watson, 2007).

Convencionalmente, os meios de maturação *in vitro* incluem formulações de hormônio folículo estimulante (FSH) obtidas a partir de extrato de hipófises suínas (pFSH). Contudo, existe uma preocupação crescente com o uso de extratos biológicos, particularmente pelo risco sanitário inerente (Abe et al. 1999). Adicionalmente, não é possível padronizar a concentração do hormônio, nem evitar a presença de contaminação com outros hormônios hipofisários, resultando em grande variação de atividade biológica entre partidas.

Produtos à base de FSH recombinante humano (rhFSH) podem ser uma alternativa ao pFSH, visto que possuem níveis de pureza mais elevados, sem contaminação cruzada (Lunenfeld et al. 2019). Já foram descritos protocolos de superestimulação ovariana e na MIV em humanos (Fish et al. 1995, Bergh et al. 1997, Williams et al. 2003). Quanto aos animais domésticos, produtos à base de rhFSH têm sido utilizados empiricamente, buscando substituir as formulações a base de extratos biológicos (Pozzobon et al. 2005, Luciano et al. 2011, Marco-Jimenez 2011). Porém, ainda é necessário caracterizar a eficiência relativa do rhFSH, comparado ao pFSH, considerando-se não apenas a produção de embriões (Ali et al. 2002), mas também parâmetros de qualidade embrionária.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a eficácia da folitropina-alfa (rhFSH) na produção *in vitro* de embriões bovinos, comparando meios de maturação *in vitro* suplementados com FSH de hipófise suína ou FSH recombinante humano.

Objetivos Específicos

- Avaliar se a concentração de soro fetal bovino interfere na resposta do FSH, analisando o grau de expansão dos complexos cumulos-oophorus (CCOs), clivagem, produção e eclosão dos blastocistos;
- Comparar se a fonte de FSH, recombinante ou de hipófise suína, influenciam no grau de expansão das células do cumulus, taxa de produção de blastocisto no sétimo dia e décimo dia, para embriões frescos e vitrificados;
- Avaliar se a fonte de FSH interfere na qualidade embrionária, através da contagem do número total de células, células do trofoblasto e a proporção MCI/Total;
- Validar os resultados em uma grande rotina comercial de PIVE.

HIPÓTESE

A folitropina-alfa (rhFSH) pode ser utilizada no meio de maturação *in vitro* sem comprometer os resultados em uma rotina comercial.

REVISÃO DE LITERATURA

Aspectos gerais da produção *in vitro* de embriões (PIVE)

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é atualmente um procedimento de enorme importância tanto na clínica reprodutiva humana quanto na produção animal. Na medicina humana estima-se que hajam hoje entre 6 e 8 milhões de crianças nascidas por esta técnica (Lonergan & Fair, 2016). Na área animal, em 2016 a produção mundial de embriões bovinos *in vitro* superou a produção *in vivo* (por superovulação), tornando-se a biotecnologia reprodutiva mais importante (Fig. 1), depois da inseminação artificial, para o melhoramento genético (Perry 2017).

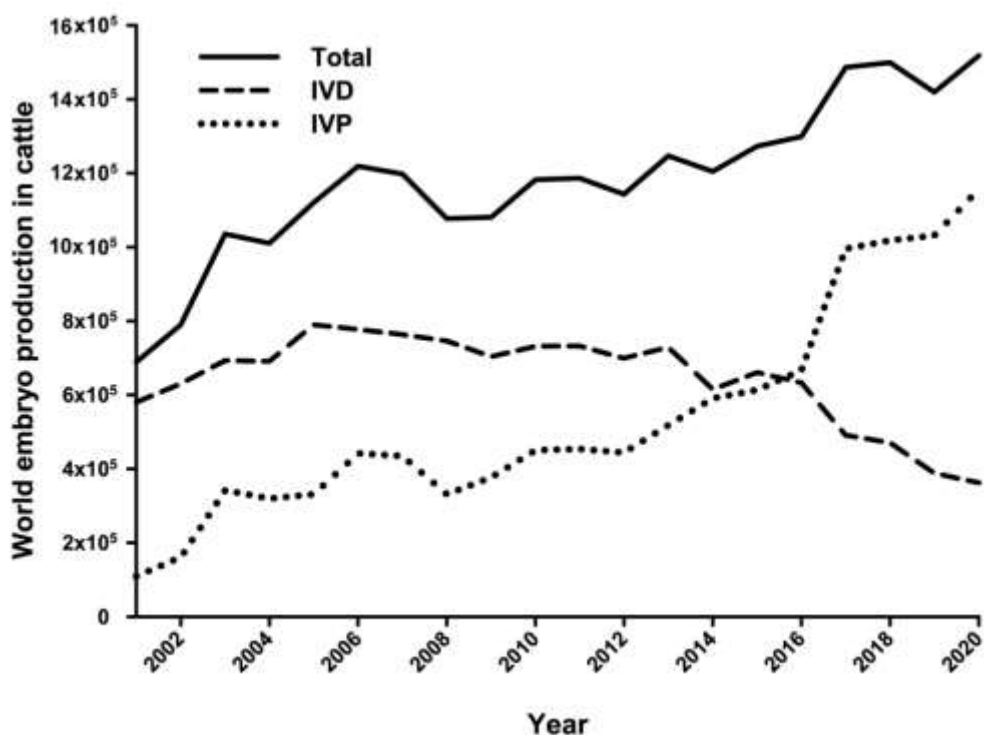


Fig. 1: Número de embriões bovinos (produzidos *in vivo* [IVD], produzidos *in vitro* [IVP] e total) registrados no período 2001-2020. Fonte: Viana, 2019

Em ambos os casos, a viabilidade do uso clínico da PIVE foi diretamente associada ao desenvolvimento da aspiração folicular orientada por ultrassonografia (*ovum pick-up* ou OPU). Esta técnica possibilita a coleta de ovócitos sem a necessidade de uma abordagem cirúrgica ou laparoscópica dos ovários (Kruip et al.

1994, Santl et al.1998). A OPU pode ser realizada em intervalos tão curtos quanto 3 a 4 dias (Viana et al. 2004), e também em animais pré-púberes (Majerus et al. 1999) ou em início de gestação (Aller et al. 2012), potencializando o número de embriões produzidos por doadora em um mesmo intervalo de tempo. Essas vantagens tornaram a OPU a técnica de eleição para a coleta de ovócitos destinados a PIVE. Contudo, a produção *in vitro* de embriões ainda é limitada, pois não é possível garantir, muitas vezes, a qualidade dos ovócitos utilizados, células importantes para o sucesso da técnica (Kussano et al. 2021).

A PIVE é constituída basicamente pela maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) de embriões (Tríbulo et al. 2019). Em bovinos os ovócitos podem ser obtidos por aspiração folicular guiada por ultrassom em animais vivos ou por ovariectomia; ou aspiração folicular *post mortem*, utilizando ovários de matadouro. Em ambos os métodos, os ovócitos são coletados de folículos antrais com cerca de 2 a 8 mm de tamanho. Os ovócitos obtidos são levados para um laboratório, para então serem avaliados e classificados de acordo com a sua qualidade morfológica. Geralmente são utilizados na PIVE apenas aqueles ovócitos com citoplasma homogêneo e que apresentam três ou mais camadas de células do cumulus. Esta etapa de seleção é importante para o sucesso de todo o processo de produção, pois já foi demonstrado que a qualidade do ovócito está diretamente relacionada com o potencial de desenvolvimento do embrião até a fase de transferência para as receptoras (Hagemann et al. 1999; Silva 2016).

Após a classificação e seleção dos ovócitos obtidos na aspiração, estes são submetidos à etapa de maturação *in vitro* (MIV). A maturação do ovócito abrange importantes eventos de transformações nucleares e citoplasmáticas, ligadas a mudanças estruturais e bioquímicas que farão com que este gameta esteja apto para ser fecundado pelo gameta masculino, o espermatozoide (Gonçalves et al. 2008). No momento em que o ovócito é retirado do folículo, já se inicia o processo de maturação, que, em condições normais, terá duração de 18 a 22 horas. Os meios e protocolos utilizados durante esse processo são variáveis, contudo, de acordo com Gonçalves e colaboradores (2007), o meio de maturação mais utilizado nos laboratórios é o TCM 199, normalmente suplementado com soro fetal bovino (SFB), hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), piruvato e antibióticos.

A próxima etapa da PIVE é chamada de fecundação *in vitro* (FIV), onde, ovócitos maturados e espermatozoides capacitados serão co-incubados em meio TALP, por aproximadamente 18 horas. Neste estágio, é importante a escolha de sêmen com fertilidade conhecida, para o aumento das taxas de blastocisto. Normalmente, os gametas masculinos são lavados e selecionados usando procedimentos de centrifugação em gradiente de densidade, para remoção do meio de congelamento, crioprotetores, plasma seminal e para selecionar a fração viva/móvel. Os espermatozoides também são expostos a fatores capacitantes para penetrarem na zona pelúcida (ZP) (An et al. 2017). Com os gametas co-incubados, a fecundação se dará pela ligação do espermatozoide à ZP do ovócito (Tríbulo et al. 2019).

Após a FIV, é realizado o cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões, etapa importante para o desenvolvimento do embrião e para o sucesso da PIVE. As condições também devem ser adequadas nesta etapa para que desenvolvimento embrionário ocorra corretamente e as estruturas cheguem até o estágio de blastocisto, na qual podem ser transferidas para as fêmeas receptoras. A composição dos meios mais utilizados é geralmente baseada no fluido do oviduto da ovelha, como o Synthetic Oviduct Fluid (SOF). Este meio tenta mimetizar a composição do fluido presente na tuba uterina e no útero. Contudo, devido à grande variação hormonal e de composição desse fluido no animal *in vivo*, é muito difícil reproduzir de maneira fiel esse ambiente *in vitro* (Gonçalves et al. 2007). Os protocolos nos laboratórios variam, mas o cultivo dura cerca de 7 dias na incubadora em condições controladas de atmosfera gasosa, temperatura e umidade. Ao final desse período, a placa de cultivo é retirada da incubadora e é realizada a contagem dos possíveis embriões por gota, classificando-os de acordo com sua etapa de desenvolvimento como mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido, blastocisto em eclosão ou blastocisto eclodido (Aguila et al. 2020). Além da classificação do desenvolvimento é feita a classificação morfológica. Em geral, 20% a 40% dos zigotos cultivados atingem o estágio de blastocisto (Rizos et al. 2008). Em seguida, os embriões podem ser transferidos para uma receptora previamente sincronizada ou criopreservados para posterior transferência. Para a criopreservação, apenas embriões de melhor qualidade são utilizados (de acordo com o manual da IETS Stringfellow & Seidel 1998.), afim de obter resultados satisfatórios de viabilidade

pós-congelamento. Um dos métodos mais utilizados é a vitrificação (Leme et al. 2016), porém, o congelamento lento para direct transfer (DT) ganhou popularidade nos últimos anos (Gómez et al. 2020).

Apesar do sucesso da técnica, a PIVE ainda apresenta taxas estáveis de blastocisto, na média geral. Esse problema está ligado principalmente à maturação incompleta dos ovócitos e condições de cultivo inadequadas, levando à não ativação do genoma embrionário ou fragmentação do DNA das células (Ferré et al. 2019). A busca por alternativas e moléculas que possam melhorar os índices da PIVE trabalhando com a CIV é constante (Amaral et al. 2022). No entanto, a primeira etapa laboratorial, MIV, já foi demonstrada como sendo crucial para o posterior desenvolvimento embrionário (Ferré et al. 2019). Dessa forma, os componentes envolvidos na MIV, como suplementos hormonais, têm se tornado alvo de pesquisa no mundo todo.

Importância da etapa de maturação *in vitro* dos ovócitos

A maturação do ovócito é um evento fisiológico necessário para o sucesso da fecundação e desenvolvimento do embrião. No decorrer da ovogênese, os ovócitos de mamíferos ficam retidos em diplóteno da prófase da primeira divisão meiótica (estágio chamado de vesícula germinativa), desde a vida fetal até pouco antes da ovulação (Wassarman & Albertini, 1999). O ovócito bovino atinge seu tamanho máximo quando o folículo que o envolve atinge um diâmetro de aproximadamente 3 mm (Fair et al. 1995). Antes da retomada da meiose, o ovócito é diplóide ($2n$), porém possui o DNA já duplicado ($4C$). A retomada da meiose pode ser mediada por um estímulo hormonal *in vivo*, em resposta a um pico pré-ovulatório de LH, ou pela retirada do ovócito de dentro do folículo, progredindo até a metáfase II e ocorrendo a extrusão do primeiro corpúsculo polar. A penetração do gameta masculino leva à extrusão do segundo corpúsculo polar. (Fig. 2) (Lonergan & Fair 2015).

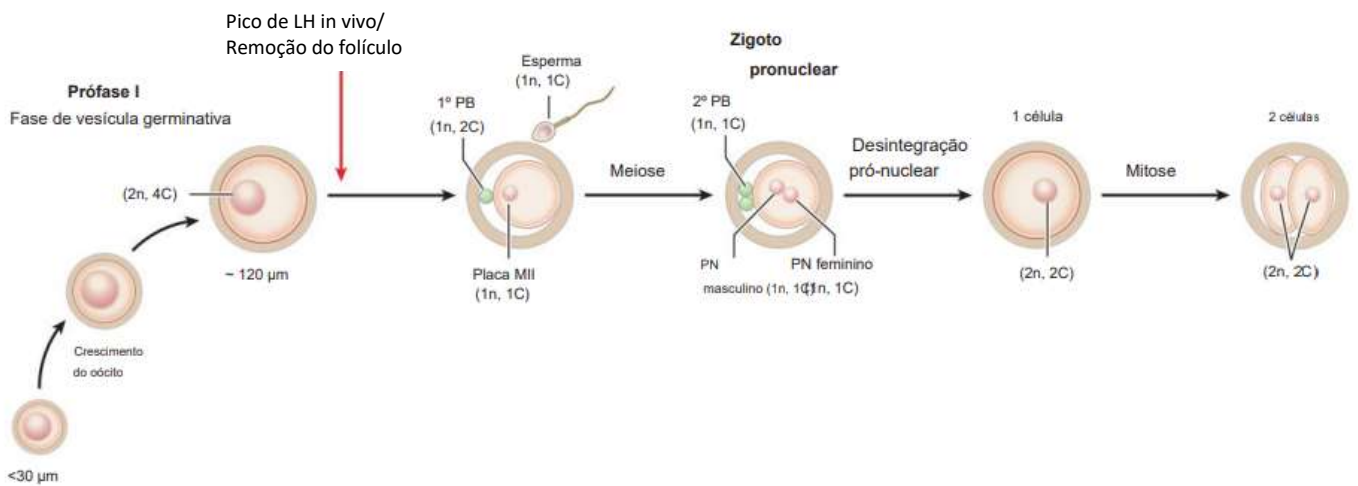


Fig. 2: Durante o desenvolvimento no ovário fetal, os ovócitos na maioria dos mamíferos param no estágio de diplóteno da prófase I (o estágio de vesícula germinativa). A retomada da meiose, desencadeada pela onda pré-ovulatória do hormônio luteinizante, e a progressão através da maturação resulta em parada adicional no estágio de metáfase II (MII) com extrusão do primeiro corpúsculo polar (PB) e estabelecimento de um complemento de DNA de $1n, 2C$. A penetração do espermatozóide ($1n, 1C$) leva à extrusão do segundo PB e estabelecimento de um estado $1n, 1C$ no ovócito levando a um embrião diplóide ($2n, 2C$) após a primeira divisão mitótica após a fertilização. Todas as divisões subsequentes são mitóticas, resultando em duas células filhas idênticas. Abreviatura: PN, pronúcleos. Fonte: adaptado de Lonergan & Fair 2015.

Somente ovócitos competentes terão a capacidade de sofrer a maturação completa. A competência é progressivamente adquirida durante os estágios finais da foliculogênese, através de várias mudanças celulares e moleculares que conferem ao ovócito a capacidade de completar a divisão meiótica, garantir o bloqueio a polispermia, descondensar a cabeça do espermatozóide, transpor a transição materno-zigótica (MZT) e prosseguir o seu desenvolvimento (Coticchio et al., 2004). Portanto, um ovócito imaturo removido do folículo deve ser capaz de sofrer por completo a maturação nuclear e citoplasmática.

Durante a maturação citoplasmática as organelas sofrem modificações quanto à morfologia e distribuição. Esse rearranjo ocorre via citoesqueleto, através dos microfilamentos e microtúbulos, e varia em cada estágio de desenvolvimento da célula (Ferreira et al. 2008). As mitocôndrias possuem um papel de extrema importância, pois são peças chave da maquinaria metabólica, responsável por fornecer a energia que será utilizada durante a maturação (Stojkovic 2001). No ovócito, as mitocôndrias se movimentam para áreas de grande consumo de energia, além de sintetizarem o ATP necessário para a síntese de proteínas que darão

suporte à conclusão da maturação e ao posterior desenvolvimento do embrião (Krisner 2004). Hyttel et al. 1997, demonstraram que as mitocôndrias se deslocam de uma posição mais periférica, para uma distribuição mais central após 12-18 horas de cultura, e esse padrão também foi observado em ovócitos *in vivo*.

Para a progressão da maturação e também para a formação do zigoto é indispensável que ocorra síntese de proteínas. Dessa forma, é necessária a presença de uma quantidade adequada de ribossomos durante a maturação. O sítio de formação das subunidades dessa organela é o nucléolo que, durante a fase de crescimento ovocitário e ativação do genoma embrionário, se encontra na forma fibrilo-granular, o que representa uma alta atividade de síntese de ribossomos e, conseqüentemente, síntese proteica (Fair et al. 2003; Hyttel et al. 2001).

Durante a maturação, modificações bioquímicas e estruturais do retículo endoplasmático são pontos cruciais para a regulação do cálcio intracelular. Essa organela faz o enovelamento de proteínas e sua degradação, metabolismo de lipídeos, compartimentalização do núcleo, regulação de íons de cálcio e síntese de membranas (Lippincott-Schwartz et al. 2000). *In vivo*, foi visto que o retículo endoplasmático se apresenta uniformemente distribuído pelo ooplasma, em ovócitos no estágio de vesícula germinativa, porém, até a metáfase II, foi observado que essa organela se apresenta em regiões corticais e se acumula na forma de clusters por todo citoplasma, com exceção nas proximidades do aparato meiótico (Stricker 2006).

Derivações do complexo de Golgi, os grânulos corticais, são organelas exclusivas dos ovócitos (Wessel et al. 2001). Já está bem elucidado que, em ovócitos no estágio de vesícula germinativa, essas organelas estão distribuídas em *clusters* pelo citoplasma e, no fim do período de maturação, na metáfase II, os grânulos se distribuem por toda a superfície interna, próximos a membrana plasmática, aguardando sua ativação (Thibault et al. 1987). Após a entrada do espermatozoide, ocorre uma mudança da matriz extracelular ovocitária, pela liberação do conteúdo dos grânulos na superfície externa, evento chave para a prevenção da polispermia (Haley & Wessel 2004).

A maturação molecular é um componente da citoplasmática (Sirard, 2001). Os eventos nucleares que ocorrem durante a maturação envolvem a reorganização da rede de microtúbulos, rompimento do envoltório nuclear, condensação dos cromossomos e progressão da meiose para metáfase I, anáfase I, telófase I,

expulsão do primeiro corpúsculo polar e retenção no estágio de metáfase II (Cha & Chian, 1998). A programação da maturação nuclear no ovócito é automaticamente ativada após a sua remoção do folículo (Sirard et al., 2006). Os ovócitos que atingem o seu crescimento total completam a maturação nuclear, mesmo na ausência de qualquer agente estimulador como, por exemplo, as gonadotrofinas (Dode & Adona, 2001; Ali & Sirard, 2005). A compactação dos nucléolos sugere a diminuição e/ou perda da atividade transcricional, sendo um indicativo de maturação (Fair et al., 1995; Hyttell et al., 1997). Um aspecto importante durante o crescimento do ovócito é seu alto grau de atividade transcricional, refletindo a importância do acúmulo de proteínas e RNAm de origem materna, os quais são necessários não só para o crescimento e maturação, mas, especialmente, para o desenvolvimento embrionário inicial (Song & Wessel, 2005).

O ovócito precisa acumular, durante a foliculogênese, todos os fatores maternos necessários para sustentar a maturação e o desenvolvimento até a ativação do genoma embrionário. Em bovinos a retomada da meiose induz a perda da capacidade de transcrição e, apesar de haver uma pequena atividade transcricional no estágio de 1-2 células (Viuff et al., 1996), o aumento substancial nessa atividade só ocorre no estágio de 8-16 células (Memili & First, 2000). A formação desse estoque de RNAm e proteínas de origem materna, que confere ao ovócito o programa molecular necessário para a transição materno zigótica (MZT), se refere à maturação molecular. Tendo em vista que ovócitos maturados *in vitro* resultam em menores taxas de blastocisto após a fecundação e o cultivo *in vitro* quando comparados aos *in vivo* (Takagi et al., 2001; Rizos et al., 2002), pode-se presumir que o baixo desenvolvimento embrionário se deve a deficiência do ovócito seja na maturação nuclear ou citoplasmática. Vários fatores podem afetar o sucesso da maturação ovocitária, entre eles pode-se destacar a competência do ovócito e condições de maturação.

Papel do FSH na maturação *in vitro*

O FSH estimula a secreção de estrógeno pelas células do cumulus, a síntese e secreção de ácido hialurônico e estimula a plasmina, regulando então a expansão das células do cumulus durante o processo de maturação *in vitro* (Ali & Sirard 2002; Richards et al 1996). A suplementação hormonal, incluindo gonadotrofinas, na MIV, embora rotineiramente empregada, é controversa, pois há grande variação entre protocolos experimentais. A utilização do FSH é usual, no entanto, Ali et al (2005), demonstraram que a presença desse hormônio é necessária apenas nas primeiras horas de MIV.

A retirada do ovócito de dentro do folículo induz a maturação espontânea (Bever & Izadyar, 2002), pois retira essa célula da influência inibitória imposta pelo ambiente folicular causa uma diminuição do AMPc intra-ovocitário, que pode ocorrer passivamente ou por ativação da fosfodiesterase A3 presente no citoplasma do ovócito (Conti et al. 1998; Richard et al. 2001), causando a retomada da meiose. Em contraste, quando o FSH está presente ele se liga ao seu receptor nas células do cumulus aumentando o AMPc, que é transmitido para o ovócito através de junções gap (Webb et al., 2002) e ativa dois tipos de proteínas kinase A (PKA) I e II. A PKA I, causa um aumento temporário dos níveis de AMPc no ovócito, prevenindo a GVBD (Rodriguez & Farin, 2004). A ativação da PKA II, por outro lado, resulta na transcrição de genes necessários para o início da maturação. Entretanto, a PKC também tem sido apontada como tendo papel importante na transdução do sinal do FSH, especialmente no que se refere aos processos de transcrição e tradução que são requeridos para a fase estimulatória da GVBD mediada pelas gonadotrofinas *in vitro* (Ali & Sirard, 2005). É possível que a inibição temporária da retomada da meiose seja essencial para que esses processos ocorram, e com isso a presença do FSH melhore o potencial de desenvolvimento dos ovócitos. O que pode ser comprovado pelo fato do FSH ser necessário somente nas primeiras horas da maturação *in vitro* (Ali & Sirard, 2005).

Fontes de FSH comercialmente disponíveis para uso em ARTs

A primeira gonadotrofina disponível comercialmente foi um extrato de hCG, em 1931 (Lunenfeld, 2012). Porém, o produto era de uso muito limitado por conta da falta de reprodutibilidade. Apenas em 1939, foi desenvolvido um padrão internacional para o hCG, em UI, que serviu como ponto de referência para a preparação da molécula. Após essa padronização, preparações purificadas de hCG extraídas da urina de mulheres durante a primeira metade da gravidez tornaram-se disponíveis (D'Amour & D'Amour, 1940). Em animais, a primeira formulação com gonadotrofinas hipofisárias foi extraída de suínos, contendo tanto FSH como LH. Em seguida, extratos hipofisários de ovelhas e gonadotrofina sérica de éguas prenhez foram obtidas (Greep et al. 1942; Steelman et al. 1955).

Em 1988 foi produzido o primeiro FSH recombinante humano. Os produtos biológicos recombinantes são proteínas produzidas a partir da tecnologia de DNA recombinante que utiliza processos biológicos para produzir drogas e moléculas grandes. As gonadotrofinas recombinantes foram produzidas a fim de diminuir as limitações inerentes aos produtos derivados de urina e hipófise, uma vez que podem ser produzidos em grande escala, com alta pureza e sem variabilidade na composição (Lunenfeld et al. 2019).

Existem, atualmente, no mercado, três compostos de rhFSH: folitropina alfa, folitropina beta e folitropina delta. A folitropina delta é produzida em células da retina fetal humana, já as folitropinas alfa e beta são produzidas em linhagens celulares de ovário de hamster chinês (CHO). Todas essas moléculas de rhFSH possuem uma sequência idêntica dos aminoácidos presentes no FSH endógeno. Contudo, esse hormônio possui naturalmente uma meia vida considerada curta, necessitando de múltiplas administrações durante um protocolo de estimulação ovariana. Formulações de folitropina alfa (Gonal-f) possuem ação prologanda, segundo estudos, despertando interesse no seu uso em protocolos (Lunenfeld et al. 2019). A folitropina alfa e beta diferem quanto aos vetores usados para a expressão gênica, enquanto a alfa utiliza vetores separados para genes α - e β -FSH, a folitropina beta é produzida a partir de um único vetor α - e β -FSH. Além disso, também existem diferenças nos processos de cultura e purificação, dessa forma a glicosilação das duas moléculas diferem. Essas variações tornam a folitropina alfa ligeiramente mais

ácida e a beta mais básica, fatores que influenciam na sua depuração metabólica, ou seja, meia vida (Goa et al. 1998).

A folitropina alfa é utilizada na rotina clínica na reprodução humana desde 1995. Atualmente, essa molécula vem despertando interesse para uso na área animal, devido a sua padronização entre doses, pureza da molécula e meia vida mais prolongada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abe H, Yamashita S, Itoh T, Satoh T, Hoshi H. Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Molec. Reprod. Develop* 1999; 53:325-335. <https://doi.org/10.1071/RD05017>.
2. ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp>. Acesso em maio de 2022.
3. Aguila L, Treulen F, Therrien J, Felmer R, Valdivia M, Smith L. Oocyte Selection for In Vitro Embryo Production in Bovine Species: Noninvasive Approaches for New Challenges of Oocyte Competence. *Animals* 2020; 10(12):2196. <https://doi.org/10.3390/ani10122196>.
4. Ali A & Sirard MA. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biology of Reproduction* 2002; 66: 901–905. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.4.901>.
5. Ali A, Paradis F, Vigneault C, Sirard MA. The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev* 2005;71:358-67. <https://doi.org/10.1002/mrd.20281>.
6. Ali A, Sirard MA. Efeito da ausência ou presença de vários suplementos proteicos no desenvolvimento adicional de oócitos de vaca durante a maturação in vitro. *Biology of Reproduction* 2002;66:901-905. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.4.901>.
7. Aller IF, Mucci NC, Kaiser GG, Ríos G, Callejas SS, Alberio RH. Transvaginal follicular aspiration and embryo development in superstimulated early postpartum beef cows and subsequent fertility after artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 2020; 219.
8. Amaral TF, de Grazia JGV, Martinhao LAG, De Col F, Siqueira LGB, Viana JHM, Hansen PJ. Actions of CSF2 and DKK1 on bovine embryo development and pregnancy outcomes are affected by composition of embryo culture medium. *Sci Rep* 2022;12(1):7503. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11447-7>.
9. An LY, Chaubal SA, Liu Y, Chen Y, Nedambale TL, Xu J, Xue F, Moreno JF, Tao S, Presicce GA, Du F. Significant heparin effect on bovine embryo development during

- sexed in vitro fertilization. *Journal of Reproduction and Development* 2017; 63:175–183.
10. Bergh C, Howles CM, Borg K, Hamberger L, Josefsson B, Nilsson L, Wikland M. Recombinant human follicle stimulating hormone (r-hFSH; Gonal-F) versus highly purified urinary FSH (Metrodin HP): results of a randomized comparative study in women undergoing assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 1997; 12:2133-9. doi: 10.1093/humrep/12.10.2133.
 11. Berglund B. Genetic improvement of dairy cow reproductive performance. *Reproduction in Domestic Animals* 2008; 43: 89–95.
 12. Bevers MM, Izadyar F. Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;197(1-2):173-8. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00270-8](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00270-8)Get.
 13. Bruyere P, Baudot A, Guyader-Joly C, Guerin P, Louis G, Buff S. Improved cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. *Theriogenology* 2012; 78:1294–1302.
 14. Cha, KY, Chian, RC. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod Update* 1998;4:103-20. <https://doi.org/10.1093/humupd/4.2.103>.
 15. Conti M, Andersen CB, Richard FJ, Shitsukawa K, Tsafiriri A. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. *Mol Cell Endocrinol* 1998;145:9-14. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(98\)00187-7](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00187-7).
 16. Cooke RF, Pohler KG, Vasconcelos JLM, Cerri RLA. Estrous expression during a fixed-time artificial insemination protocol enhances development and interferon-tau Messenger RNA expression in conceptuses from *Bos indicus* beef cows. *Animal* 2019; 13(11):2569 – 2575. <https://doi.org/10.1017/S1751731119000636>
 17. Coticchio G, Sereni E, Serrao L, Mazzone S, Iadarola I, Borini A. What criteria for the 19 definition of oocyte quality? *Acad Sci.* 2004; 1034:132-44. <https://doi.org/10.1196/annals.1335.016>.
 18. D'Amour FE, D'Amour MC. The biologic potency of international standard chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 1940; 26:93–6. doi: 10.1210/endo-26-1-93.
 19. Dode MAN, Adona PR. Developmental capacity of *bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. *Anim Reprod Sci* 2001;65:157-70. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00207-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00207-4).

20. Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol. Reprod. Dev* 1995;42:437–42. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080420410>.
21. Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci* 2003;78:203-16. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00091-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00091-5).
22. Faria OAC, Kawamoto TS, Dias LRO, Fidelis AAG, Leme LO, Caixeta FMC, Gomes ACMM, Sprícigo JFW, Dode MAN. Maturation system affects lipid accumulation in bovine oocytes. *Reprod Fertil Dev.* 2021 Mar;33(5):372-380. doi: 10.1071/RD20254. PMID: 33684338.
23. Ferré LB, Kjelland ME, Strobech LB, Hyttel P, Mermillod P, Ross PJ. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal* 2019; 14(5):991-1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>.
24. Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: acquisition of competence for development. *Rev. Bra. Reprod. Animal* 2008; 32(3):172-181.
25. Fisch B, Avrech OM, Pinkas H, Neri A, Rufas O, Ovadia J, Loumaye E. Superovulation before IVF by recombinant versus urinary human FSH (combined with a long GnRH analog protocol): a comparative study. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12:26-31. doi: 10.1007/BF02214125.
26. Goa KL, Wagstaff AJ. Follitropin alpha in infertility: a review. *BioDrugs* 1998; 9:235–60. doi: 10.2165/00063030-199809030-00006.
27. Goddard ME, Hayes BJ and Meuwissen THE. Genomic selection in livestock populations. *Genetics Research* 2010; 92, 413–421. <https://doi.org/10.1017/S0016672310000613>
28. Gonçalves PBD, Barreta MHB, Sandri LRS, Ferreira R, Antoniazzi AQ. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2007; 31:212-217.
29. Gómez E, Carrocera S, Martín D, Pérez-Jánez JJ, Prendes J, Prendes JM, Vázquez A, Murillo A, Gimeno I, Munoz M. Efficient one-step direct transfer to recipients of thawed bovine embryos cultured in vitro and frozen in chemically defined medium. *Theriogenology* 2020; 146:39-47. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.056>.

30. Gonçalves PBD, Figueredo JR, Freitas VJF. Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal. 2. Ed. São Paulo: Roca, 2008, 395.
31. Gonzalez-Marin C, Lenz RW, Gilligan TB, Evans KM, Gongora CE, Moreno JF, Vishwanath R. SexedULTRA™, a new method of processing sex sorted bovine sperm improves post-thaw sperm quality and in vitro fertility. *Reproduction, Fertility and Development* 2017; 29: 204–204. <https://doi.org/10.1071/RDv29n1Ab191>
32. Greep RO, Van Dyke HB, Chan BF. Gonadotropins of the swine pituitary: various biological effects of purified thylakentrin (FSH) and pure metakentrin (ICSH). *Endocrinology* 1942; 30:635–49. doi: 10.1210/endo-30-5-635 12.
33. Hagemann IJ, Beaumont SE, Berg M, Donnison MJ. Development During Single IVP of Bovine Oocytes From Dissected Follicles: Interactive Effects of Estrous Cycle Stage, Follicle Size and Atresia. *Molecular Reproduction and Development* 1999; 53: 451–458.
34. Haley SA, Wessel GM. Regulated proteolysis by cortical granule serine protease 1 at fertilization. *Mol Cell Biol* 2004;15:2084-2092. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-11-0843>.
35. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01147.x>
36. Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 1997; 47, 23–32. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(96\)00336-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00336-6)
37. Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*. 1997;47: 23-32. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(96\)00336-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00336-6).
38. Hyttel P, Viuff D, Fair T, Launricik J, Thomsen PD, Callensen H, Vos PLAM, Hendriksen PJM, Dieleman SJ, Schellander K, Besenfelder U, Greve T. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction* 2001;122:21-30.
39. Krisher RL. The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci* 2004;82 E-Suppl:14-23. doi: 10.2527/2004.8213_supplE14x.
40. Kruij THAM, Boni R, Wurth YA, Roelofsen MWM, Pieterse MC. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 1994; 42:675-684.

41. Kussano NR, Leme LO, Dode MAN. Protein source in maturation media affects gene expression in cumulus cells and embryo development in cattle. *Anim Biotechnol.* 2021 Dec 29;1-14. doi: 10.1080/10495398.2021.2019755. Epub ahead of print. PMID: 34964703.
42. Leme LO, Dufort I, Spricigo JFW, Braga TF, Sirard AM, Franco MM, Dode MAN. Effect of vitrification using the Cryotop method on the gene expression profile of in vitro–produced bovine embryos. *Theriogenology* 2016; 85(4):724-733.
43. Lippincott-Schwartz J, Roberts TH, Hirshberg K. Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:557-589. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.557>.
44. Lonergan P, Fair T. Maturation of Oocytes in Vitro. *Annu. Rev. Anim. Biosci* 2016; 4:10.1–10.14.
45. Luciano AM, Franciosi F, Modena SC, Lodde V. Gap Junction-Mediated Communications Regulate Chromatin Remodeling During Bovine Oocyte Growth and Differentiation Through cAMP-Dependent Mechanism(s). *Biology of Reproduction* 2011; 85: 1252-1259. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.092858>.
46. Lunenfeld B, Bilger W, Longobardi S, Alam V, D’Hooghe T, Sunkara SK. The Development of Gonadotropins for Clinical Use in the Treatment of Infertility. *Frontiers in Endocrinology* 2019; 10:429. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00429>.
47. Lunenfeld B. Gonadotropin stimulation: past, present and future. *Reprod Med Biol* 2012;11:11–25. doi: 10.1007/s12522-011-0097-2.
48. Majerus V, De Roover R, Etienne D, Kaidi S, Massip A, Dessy F, Donnay I. Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. *Theriogenology* 1999; 52:116-179.
49. Marco-Jiménez F, Vicente JS, Viudes-de-Castro MP. Effect of lanosterol on the in vitro maturation in semi-defined culture system of prepubertal ewe oocytes. *Zygote* 2014; 22:50-7. doi: 10.1017/S096719941100044X.
50. Memili E, First NL. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanism of early gene expression as compared with other species. *Zygote* 2000;8:87-96. <https://doi.org/10.1017/S0967199400000861>.
51. Perry G. Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *IETS Data Retrieval Committee* 2017; 35(4).

52. Pozzobon SE, Lagares MA, Brum DS, Leivas FG, Rubin MI. Addition of recombinant human growth hormone to in vitro maturation medium of bovine oocytes. *Reprod Domest Anim* 2005; 40:19-22. doi: 10.1111/j.1439-0531.2004.00547.x.
53. Richard FJ, Sirard MA. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. *Biology of Reproduction* 1996;54:22-28. <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.1.22>.
54. Richard FJ, Tsafiriri A, Conti M. Role of phosphodiesterase type A3 in rat oocyte maturation. *Biol Reprod* 2001;65:1444-51. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.5.1444>
55. Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, De La Fuente J, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in Domestic Animals* 2008; 43: 44–50.
56. Rizos D, Lonergan P, Ward F, Duffy P, Boland MP. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implication for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 2002;61:234-48. <https://doi.org/10.1002/mrd.1153>.
57. Rodriguez KF, Farin CE. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reprod Fertil Dev* 2004;16:55-67. doi: 10.10371/RD03078.
58. Santl B, Wenigerkind H, Scherthaner W, Modl J, Stojkovic M, Prella K, Holtz W, Brem G, Wolf E. Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in simmental heifers. *Theriogenology* 1998; 50: 89-100.
59. Silva PF. Revisão bibliográfica das técnicas laboratoriais de melhoramento genético de bovinos de corte no Brasil. Monografia (Graduação). Faculdade São Lucas, Porto Velho, 2016.
60. Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 2006;65:126-36. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.020>.
61. Sirard MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*. 2001;55(6):1241-54. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00480-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00480-0).
62. Song JL, Wessel GM. How to make an egg: transcriptional regulation in oocytes. *Differentiation* 2005;73:1-17. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2005.07301005.x>.

63. Steelman SL, Lamont WA, Baltus BJ. Preparation of highly active follicle stimulating hormone from swine pituitaries. *Endocrinology* 1955; 56:216–7. doi: 10.1210/endo-56-2-216.
64. Stojkovic M, Machado AS, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod.* 2001;64: 904-9. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>.
65. Stricker SA. Structural reorganization of the endoplasmic reticulum during egg maturation and fertilization. *Sem Cell Dev Biol* 2006;17:303-313.
66. Stringfellow DA, Seidel SM. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões 1998. IETS, p. 112-113.
67. Takagi M, et al. Impaired final follicular maturation in heifers after superovulation with recombinant human FSH. *Reproduction* 2001;121:941-51.
68. Thibault D, Szollosi D, Gérard M. Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev* 1987;27:865-896. <https://doi.org/10.1051/rnd:19870701>.
69. Tríbulo P, Rivera RM, Obando MSO, Jannaman EA, Hansen PJ. Production and Culture of the Bovine Embryo. *Methods in Molecular Biology* 2019; 2006:115-129. doi:10.1007/978-1-4939-9566-0_8.
70. USDA Foreign Agricultural Service Gain Report Global Agricultural Information Network. Brazil Livestock and Products Semi-annual. 2019 Semiannual Livestock. Gain Report Number BR 1904, 2019.
71. Viana JHM, Camargo LSA, Ferreira AM, De Sa WF, Fernandes CAC, Marques Junior AP. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Animal Reproduction Science* 2004; 84:1-12.
72. VIANA JHM. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Embryo industry on a new level: over one million embryos produced in vitro. *Embryo Technology Newsletter* 2020; 36(4).
73. Viuff D, Avery B, Greve T, King WA, Hyttel P. Transcriptional activity in in vitro produced bovine two- and four-cell embryos. *Mol Reprod Dev* 1996;43:171-9. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199602\)43:2<171::AID-MRD6>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199602)43:2<171::AID-MRD6>3.0.CO;2-O).

74. Wassarman PM, Albertini DF. The mammalian ovum. In: The physiology of Reproduction, New York: Raven, NY. 1994, p. 79- 122, 1999.
75. Watson AJ. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of Animal Science* 2007; 85, E1–E3. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-432>
76. Webb RJ, Marshall F, Swann K, Carrol J. Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in cAMP and protein kinase a in mammalian oocytes. *Dev Biol* 2002;246:441-54. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0630>.
77. Wessel GM, Brooks JM, Green E, Haley S, Voronina E, Wong J, Zaydfudim V, Conner S. The biology of cortical granules. *Int Rev Cytol* 2001;209:117-206. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(01\)09012-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(01)09012-X).
78. Williams RS, Vensel T, Siström CL, Kipersztok S, Rhoton-Vlasak A, Drury K. Pregnancy rates in varying age groups after in vitro fertilization: a comparison of follitropin alfa (Gonal F) and follitropin beta (Follistim). *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189:342-6; discussion 346-7. doi: 10.1067/s0002-9378(03)00728-2.

CAPÍTULO 2

Artigo submetido ao periódico Theriogenology no dia 15/06/2022

Use of purified porcine FSH or follitropin-alpha (rhFSH) during *in vitro* maturation of Nelore breed (*Bos taurus indicus*) oocytes: effects on embryo production and developmental potential

Leticia Prates Martins^a, Luany Alves Galvão Martinhão^{a,b}, João Gabriel Viana de Graziab^b, Otavio Augusto Costa de Faria^a, Ricardo Alamino Figueiredo^c, Joao Henrique Moreira Viana^{a,c}

^a Universidade de Brasília, Brasília, DF, 70910-900 Brazil

^b FIVX Apoyar FIV Biotech, Juiz de Fora, MG, 36035-410 Brazil

^c Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, 70770-901 Brazil

Running title: Use of rhFSH for *in vitro* embryo production in cattle

Use of purified porcine FSH or follitropin-alpha (rhFSH) during *in vitro* maturation of Nelore breed (*Bos taurus indicus*) oocytes: effects on embryo production and developmental potential

ABSTRACT

This study evaluated the use of porcine FSH (pFSH) or follitropin-alpha, a recombinant human FSH (rhFSH), during *in vitro* maturation (IVM) of cumulus-oocyte complexes (COC) recovered from Nelore (*Bos taurus indicus*) cattle. We performed four experiments, all using grade I COC (n=11,245) submitted to IVM in TCM199 without FSH (-FSH) or supplemented with either 0.5 µg/mL pFSH (Folltropin-V, Exp. 1 to 4) or 0.1 IU rhFSH (Gonal-F, Exp. 2, 3 and 4). The remaining procedures, media, and culture conditions for *in vitro* embryo production (IVEP) were similar. In Exp. 1, COC (1,047) were IVM with: a) 10% FBS and pFSH; b) 10% FBS without FSH; c) 1% FBS and pFSH; or d) 1% FBS without FSH. Cumulus expansion was greater ($P<0.0001$) in the presence of pFSH, regardless of FBS concentration. Both FSH and FBS increased cleavage and blastocyst rates ($P<0.05$), but no FSH x FBS interaction was observed ($P>0.05$). In Exp. 2, COC (n=2,791) were IVM in the absence of FSH (-FSH) or with pFSH or rhFSH, and underwent IVEP. Blastocysts were assessed for hatching as fresh or after vitrification and thawing. Cumulus expansion and blastocyst rates were greater ($P<0.05$) in groups treated with (pFSH and rhFSH) than without FSH (-FSH). However, there was no effect of treatment ($P>0.05$) on hatching rates of fresh or vitrified blastocysts. In Exp. 3, COC (n=720) were IVM in groups -FSH, pFSH or rhFSH, and the expanded blastocysts produced were stained with Hoechst 33342 and propidium iodide. Blastocysts from the rhFSH group presented more cells in the trophoblast ($P=0.0002$), but not in the ICM ($P=0.3231$), when compared with pFSH and -FSH groups. In Exp. 4, we used the same experimental design as in Exp. 2 but in a commercial IVEP routine, which included the use of COC recovered by OPU and Y-sorted semen, and the transfer of part of the blastocysts produced. Both pFSH and rhFSH increased cleavage ($P=0.0035$) and blastocyst rates ($P=0.0102$), but not pregnancy rate ($P=0.1080$), compared with -FSH. In summary, follitropin-alpha is an alternative to pFSH as a medium supplement for IVM of bovine COC.

Keywords: cattle, gonadotropins, *in vitro* maturation, cumulus-oocyte complexes

1. Introduction

During the final steps of follicular development the FSH, and later, the preovulatory LH peak, trigger cumulus-oocyte complex (COC) maturation within the preovulatory follicle. Oocyte maturation involves a well-coordinated sequence of cytoplasmic and nuclear events that are key for the acquisition of the capacity by the oocyte to undergo fertilization and subsequent embryo development (reviewed by [1]). When immature COC are removed from the follicle, they spontaneously resume meiosis, regardless of cytoplasmic maturation [2]. Therefore, assisted reproductive technologies (ART) using immature oocytes require an initial step to promote *in vitro* maturation (IVM) of the COC recovered, which is critical for the subsequent *in vitro* embryo production (IVEP) outcomes [3].

In most IVM protocols used for IVEP in cattle, medium is supplemented with FSH, aiming to mimic the physiological actions of this gonadotropin during follicle maturation *in vivo*. The FSH is known to have a range of effects during COC maturation, including modulation of gene expression patterns [4], protein synthesis [5], glucose uptake and lactate production [6], and extracellular matrix synthesis [7], which leads to cumulus cell expansion and supports acquisition of developmental competence by the oocyte. The FSH formulations currently available for use in livestock are obtained by extraction from porcine hypophysis (pFSH). Although this source of FSH has been used for decades, it has some drawbacks. Due to the impossibility of fully standardizing the raw material used, the biological activity of commercial pFSH varies from batch to batch [8], and presents some degree of contamination with other hormones such as LH and TSH [9]. Moreover, there is an intrinsic sanitary risk in the inter-species use of biological extracts, as well as the chance to induce immune recognition [10,11]. Recently, the supply of pFSH has not met the increasing demand for this hormone, resulting in increasing prices or even in a supply shortage in some markets.

In human reproductive medicine, human menopause gonadotropin (hMG) obtained from urine extracts has been replaced by FSH produced using recombinant DNA technologies [12-14]). The recombinant human FSH (rhFSH) presents less variation in biological activity and no cross contamination by other hypophysary hormones [11,15]. Over the past few decades, a number of protocols for ovarian

superstimulation in women were developed using rhFSH [16]. In non-human species, the use of rhFSH has also been reported, both *in vivo* [17-19] and as a media supplement during IVM of oocytes in pigs [20], cattle [21-23] and ewes [24]. However, whether rhFSH is an alternative for pFSH in a commercial IVEP routine in livestock still needs to be properly evaluated. Very few studies directly contrasted pFSH and rhFSH, evaluating a limited number of endpoints and with contradictory results [25,26]. Therefore, up to date the replacement of pFSH by rhFSH for IVEP in cattle remains mostly empirical, particularly in breeds other than *Bos taurus taurus*. Moreover, different rhFSH molecules have become commercially available (e.g., follitropin-alpha, -beta, -delta, and -epsilon, corifollitropin), presenting a range of biological activity and pharmacodynamics [11,27], and rhFSH should not be referred to as a unique molecule. The aim of this study was to compare the use of pFSH and follitropin-alpha during IVM of cattle COC, regarding cumulus expansion, blastocyst and hatching rates, embryo morphological quality and cryotolerance, and subsequent pregnancy rates. We hypothesized that pFSH can be replaced by follitropin-alpha without compromising outcomes in a large IVEP routine with *Bos taurus indicus* breeds.

2. Material and Methods

Unless stated elsewhere, all chemical used were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

2.1. Experimental design

This study was subdivided into four experiments, all of them using grade I bovine COC recovered from slaughterhouse ovaries (mostly Nelore breed, *Bos taurus indicus*) and submitted to *in vitro* maturation (IVM) in Tissue Culture Medium 199 Earle's salts (TCM199) without FSH (-FSH) or supplemented with either 0.5 µg/mL pFSH (Follitropin-V, Vetoquinol, São Paulo, Brazil, Experiments 1 to 4) or with 0.1 IU/mL (7.3 ng/mL) rhFSH (follitropin-alpha, Gonal-F, Merck, Darmstadt, Germany, Experiments 2, 3 and 4). The pFSH and rhFSH doses used followed those previously tested and used as routine by the IVEP laboratories enrolled in this study

[28,29]. The remaining procedures, media, and culture conditions for *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* culture (IVC) were similar for all experiments.

Experiment 1 aimed to evaluate whether the concentration of fetal bovine serum (FBS) would affect the response of COC to pFSH during IVM. COC (n=1,047) were randomly allocated into four groups, which underwent IVM in TCM199 supplemented with: a) 10% FBS and FSH (10% + pFSH, n=257); b) 10% FBS without pFSH, (10% - FSH, n=260); c) 1% FBS and pFSH (1% + pFSH, n=257); or d) 1% FBS without pFSH (1% -FSH, n=273), in three replicates. Cumulus expansion was evaluated at 22h of IVM and subjectively scored as absent (1), poor (2) or good (3). Semen from an Angus sire of known fertility was used for IVF. Cleavage and blastocyst rates were evaluated at days 3, 6, and 7 of IVC. Hatching rate was calculated based on the number of blastocysts formed at day 7 that hatched at day 10 of IVC.

Experiment 2 aimed to evaluate the effect of the source of FSH (pFSH or rhFSH) on cumulus expansion, cleavage, blastocyst and hatching rates, and on embryo cryotolerance. COC (n=2,791) were randomly allocated into groups -FSH (negative control), pFSH or rhFSH, and underwent IVEP in 10 replicates. Cumulus expansion, as well as cleavage and blastocyst rates, were evaluated as described in Experiment 1. In a subset of the IVEP batches (n=945 COC), blastocysts were left in the culture drops and reassessed at day 10 for hatching. In the remaining batches, expanded blastocysts grade I (n= 72, 69 and 71 from -FSH, pFSH and rhFSH, respectively) were IVC after vitrification and thawing and evaluated for hatching after 72h.

Experiment 3 aimed to evaluate the effect of the source of FSH on expanded blastocyst morphological quality, assessed by embryo cell number. COC (n=720) were randomly allocated into groups -FSH, pFSH or rhFSH and underwent IVEP in 2 replicates. Expanded blastocysts grade I (n= 21, 17 and 15 from -FSH, pFSH and rhFSH, respectively) were submitted to differential staining using Hoechst 33342 and propidium iodide to evaluate the number of cells in the trophoblast, ICM, or total cells, and the ICM:total ratio.

In Experiment 4 we used an experimental design similar to the one described in Exp. 2, but in a commercial IVEP routine. COC were recovered from live Nelore (*Bos taurus indicus*) donors by OPU (n=3,521) or from slaughterhouse ovaries (n=3,176), and Y-sorted Angus semen from two sires were used for IVF. In each replicate, COC

were randomly allocated into group pFSH (laboratory standard, n=3,536) or to groups -FSH (n=1,594) or rhFSH (n=1,567), and underwent IVEP in 14 replicates. Cleavage and blastocyst rates were evaluated as previously described. A subset of the blastocysts produced (n=1,542) was classified according to developmental stage (early blastocyst, blastocyst, expanded blastocyst, or hatching blastocyst) and nonsurgically transferred to previously synchronized recipients. Pregnancies were diagnosed 23 to 30 days later by B-mode ultrasonography.

All procedures were approved by the Embrapa Ethics in the Use of Animals Committee (Protocol CEUA-001/2022).

2.2. Oocyte recovery and in vitro embryo production

The COC used were recovered from ovaries collected post-mortem at the Alvorada Slaughterhouse, located at Alta Floresta, MT, Brazil. The ovaries were transported to the laboratory in 0.9% saline at 37°C, where follicles with 3 to 8 mm diameter were aspirated using a 18G needle connected to a 10 mL syringe. The follicular fluid recovered was transferred to 50 mL Falcon tubes kept at 36°C. After decanting, the supernatant was discarded and the pellet was washed three times with 20 mL saline before being transferred to a 100 x 20 petri dish (cell culture treated, nonpyrogenic polystyrene, Corning, NY, USA) for identification and selection of grade I COC. The selected COC were washed twice in 60µL drops of TCM199 and transferred to cryotubes (5 mL polystyrene round-bottom tube, Falcon, Brookings, SD, USA) containing 400 µL of IVM medium and covered with 200 µL mineral oil (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA). Each tube received circa 30 COC and was labeled according to the experimental group.

The IVM medium consisted of TCM199 supplemented with 22 µg/mL pyruvate and 50 µg/mL amikacin. In experiments 2, 3, and 4, 10% (v/v) FBS was added, whereas in Experiment 1 either 1% or 10% FBS was used. The IVM medium was homogenized, filtered in 0.22 micra membranes and distributed in aliquots, which were then supplemented with 50 µg/mL hCG (Chorulon, MSD, São Paulo, SP, Brazil), 1 µg/mL estradiol, 6.25 µg/mL insulin, 1 µL/mL β-mercaptoethanol, and either no FSH, pFSH, or rhFSH, according to the experimental design. The aliquots of media were stored at 5°C until use.

IVM was performed in incubators at 38.5°C and 5.5% CO₂ under humidified atmosphere during 22h. The COC were then transferred to 60 x 15 mm petri dishes (Corning) for evaluation of cumulus expansion, washed with 100µL IVF medium, and transferred to 50 µL IVF medium drops covered with mineral oil (Irvine Scientific) on 35 x 10 mm petri dishes (Corning). The IVF medium consisted of TALP (Tyrode's albumin lactate pyruvate) supplemented with 50 µg/mL amikacin, 6 mg/mL fatty acid free BSA, 40 µL/mL of a 2 µM penicillamine solution, 1 µM hipotaurine, 0.25 µM epinephrine and 10 µg/mL heparin. Viable sperm was separated using PureSperm (NidaCon International AB, Mölndal, Sweden), according to manufacturer's instructions, and circa 1.2 x 10⁶ sperm/mL were added to the IVF drops. Co-incubation was performed during 18h at 38.5°C and 5.5% CO₂. After that, the presumptive zygotes were denuded, washed in SOF to remove cumulus cells and sperm, and cultured in 60 µL drops covered with 3.8 mL mineral oil (Irvine Scientific) on 35 x 10 mm petri dishes (Corning), under low oxygen atmosphere (5.5% CO₂ and 5.5% O₂, at 38.5°C). Each 10 mL aliquot of SOF was supplemented with 50 µl of 50 µg/mL amikacin, 0.03 g fatty acid free BSA and 300 µl FBS. On days 3 and 6, 70% of the SOF was renewed in each drop.

2.3. Vitrification and warming

At day 7 of IVC, a subset of the grade I expanded blastocysts from Experiment 2 was cryopreserved by vitrification, as previously described [28], and stored in liquid nitrogen (N₂). Briefly, the embryos were washed in two 100 µL drops of vitrification solution 1, then placed for 3 min in a 200 µL drop of vitrification solution 2, and for 30 s in a 50 µL drop of vitrification solution 3. The embryos were then individually transferred to an adapted vitrification straw (OPS) and immediately submersed in liquid N₂. The vitrification straws were stored in racks in a liquid N₂ container. Embryos were thawed by placing the tip of the vitrification straw in 1 mL of devitrification solution A for 1 min. Thawed embryos were then placed in 1 mL of devitrification solution B for 5 min, washed in three 60 µL drops of SOF, and submitted to IVC as previously described in section 2.2. Blastocyst re-expansion and hatching rates were evaluated after 72h. The vitrification and devitrification solutions

were prepared with variable concentrations of glycerol and ethylene-glycol, according to formula under intellectual protection by the laboratory.

2.4. Differential staining

The differential staining technique used was described elsewhere (adapted from [30]). Briefly, embryos were placed for 30 s in a 500 µl propidium iodine solution (PI 100 µg/mL), prepared with 50 µL PI and 950 µL Triton X 0.3% solution (3 µL of Triton X-100 diluted in 997 µL PBS/PVP), followed by three washes in 500 µL PBS/PVP (50 mL PBS 10 mM plus 0.05 g PVP). Embryos were then transferred to a Hoechst 33342 solution (H33342, 5.0 mg/mL), prepared with 0.2 µL H33342 and 1000 µL paraformaldehyde 4% (200 µL paraformaldehyde 20% and 800 µL PBS/PVP), for 15 min, followed by three washes in PBS/PVP. All steps were done in four-well dishes (Cultura Nunc, Thermo Scientific Nunc, São Paulo, Brazil). Solutions were kept at 36°C until use. Slowfade (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EUA) was used to delimitate a circular area in a glass slide. Embryos (5 by slide) were placed within this circle under a coverslip. The slides were evaluated under fluorescence microscopy (Axiophot 2, Zeiss, Jena, Germany) using a wavelength of 460 nm for the H33342 and 560 nm for the PI. Total, trophoblast and ICM cells were counted under 40X magnification.

2.5. Embryo transfer

Embryos from Experiment 4 were transferred to previously synchronized recipients, mostly Nelore breed, raised under pasture with *ad libitum* access to water and mineral supplement. The synchronization protocol consisted of the insertion of an intravaginal progesterone device (1.9 g, CIDR, Zoetis, São Paulo, SP, Brazil) and injection of 2 mg estradiol benzoate IM (Gonadiol, Zoetis) at day -8; removal of the CIDR and injection of 12.5 mg dinoprost (Lutalyse, Zoetis), eCG (Novormon, Zoetis; 200 IU for heifers and 300 IU for cows) at day -2, and 0.6 mg estradiol cypionate (ECP; Zoetis) at day 0 (expected ovulation). At day 7, the ovaries were scanned using an ultrasound device equipped with a linear 5-8 MHz probe (SonoScape E5, Shenzhen, China) to check for the presence and location (right or left) of a corpus

luteum. Only recipients with a morphologically functional CL were used. Embryos at blastocyst stage (early blastocysts, blastocysts, or expanded blastocysts) at day 7 of IVC were loaded in 0.25 mL straws in SOF medium supplemented with 5% (v/v) FBS, 0.8 mg/mL HEPES, 3 mg/mL fatty acid free BSA and 0.25 µg/mL amikacin. The straws were sealed and transported to the farms at 37°C in a portable incubator (WTA, Cravinhos, SP, Brazil). Embryos were transferred non-surgically to the uterine horn ipsilateral to the CL.

2.6. Data analysis

Aiming to evaluate potential FSH x FBS interactions (Exp. 1), or account for effects of replicate (Exp. 2), sire, and source of COC (Exp. 4) within groups, data expressed as percentage (cleavage, blastocyst and hatching rates) were assumed as continuous variables, and were tested for distribution pattern and submitted to ANOVA using the Proc Univariate and the Glimmix procedures of SAS (SAS Studio 3.8, University Edition; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), respectively. In Exp. 2, the model used for IVEP outcomes included the effects of group, replicate, and replicate within groups, whereas the model used for hatching rates included the effects of group, cryopreservation, and group x cryopreservation interaction. In Exp. 4 the model included the effects of source of COC (OPU or slaughterhouse), sire, and replicate. In the lack of significant effects within groups, the raw data was analyzed by the Chi-squared method using the Proc Freq of SAS. Quantitative variables (cell counts) were also tested for normality and submitted to ANOVA using the Glimmix procedure. Differences among means were contrasted using the Tukey test. Discrete variables (expansion grade) were analyzed using the Proc Npar procedure of SAS, and differences compared using the Kruskal-Wallis test. A P-values of <0.05 was considered as significant. Results are presented as means±SEM or percentages.

3. Results

3.1 Experiment 1

In all replicates, COC presented a greater ($P < 0.0001$) expansion of cumulus cells in the presence of pFSH, regardless FBS concentration (Fig. 1). IVEP outcomes are shown in Figure 2. Both FSH and FBS affected cleavage and blastocyst rate at day 7 ($P < 0.01$). However, these effects were independent, as no FSH x FBS interaction was observed at any endpoint analyzed. There was neither effect of FSH nor FBS ($P > 0.05$) on hatching rate.

3.2 Experiment 2

All COC from the groups treated with FSH (pFSH and rhFSH) presented good cumulus expansion, which differed ($P < 0.0001$) to the poor expansion observed in the COC that underwent IVM in the absence of FSH (Fig. 3).

We observed an effect of replicate ($P < 0.0001$), but not of replicate within group ($P > 0.05$), for blastocyst rates at days 6 and 7. Differences among groups were only observed for blastocyst rate at day 7 ($P = 0.0258$), which was lower for COC matured without FSH. There were no effects of group ($P = 0.3569$), cryopreservation ($P = 0.2529$), or group x cryopreservation interaction ($P = 0.8079$) on hatching rates. The cleavage, blastocyst and hatching rates of fresh or vitrified blastocysts from groups -FSH, pFSH and rhFSH are shown in Table 1.

3.3 Experiment 3

The cell counts after differentially staining expanded blastocysts with Hoescht and propidium iodide are shown in Table 2. Blastocysts obtained from COC matured in the presence of rhFSH presented more trophoblast cells than those from pFSH and -FSH groups ($P = 0.0002$). However, there was no difference in the number of cells in the ICM among groups ($P = 0.3231$). Therefore, embryos from the rhFSH group had more total cells, but less ICM/total ratio, when compared with the negative control (-FSH).

3.4 Experiment 4

Sire ($P=0.0061$) and replicate ($P<0.0001$), but not the source of COC (slaughterhouse vs. OPU, $P=0.2726$), affected blastocyst rate. However, both sire and replicate effects were evenly distributed within groups -FSH, pFSH and rhFSH. As observed in Exp. 2, both pFSH and rhFSH increased ($P=0.0102$) blastocyst rates at day 7, compared to the negative control (-FSH). Moreover, we were able to detect also differences in cleavage rates (Tab. 3) between the groups receiving or not FSH. The use of rhFSH resulted in a smaller proportion of early blastocysts and in a greater proportion of expanded blastocysts, compared with pFSH ($P<0.05$). Unfortunately, data from a large number of ET were lost due to misidentification of embryo recipients. No difference in pregnancy rates was observed for the remaining transfers.

4. Discussion

The replacement of protein extracts by synthetic molecules generated using recombinant DNA technology is a general trend in biomedicine, aiming to reduce variability in results or to avoid sanitary risks. In the current study, we evaluated the use of follitropin-alpha, a variant of rhFSH, during IVM of bovine oocytes, and evaluated a range of endpoints of interest. Our results confirm that rhFSH is an alternative to pFSH, whereas the lack of FSH during IVM has a negative impact on COC expansion and on subsequent blastocyst rate, but not on the developmental potential of the embryos produced.

In the present study we first tested the combined effects of FBS and FSH during IVM. As expected, the lack of FSH compromised cumulus expansion, and both the presence of pFSH and the concentration of FBS (1% vs 10%) affected blastocyst rate. However, these effects were independent, though additive, as no FBS x pFSH interaction was observed for any endpoint. Although it is generally accepted that FBS has positive effects on IVM of cattle oocytes [31-33], as observed in our study, contradictory results showing detrimental effects of protein supplementation have also been reported [21]. However, comparison of results among studies requires caution, due to the intrinsic variability among batches of FBS,

as well as on the composition of media used for IVM and subsequent embryo culture. Within the culture conditions of the current study, there was no effect of serum on the degree of cumulus expansion in response to pFSH. Therefore, we standardized 10% FBS for the subsequent experiments.

In experiments 2 and 4, we found no differences between pFSH and rhFSH neither in cumulus cell expansion, nor in cleavage, blastocyst, or hatching rates. To our knowledge, this is the first study contrasting pFSH and follitropin-alpha on a large-scale (>10,000 oocytes) and in conditions similar to those of a commercial IVEP routine, i.e., using COC recovered both from slaughterhouses and by OPU, and with unsorted or sex-sorted semen. The potential of rhFSH to induce cumulus expansion and meiotic progression (GVBD), in a similar fashion to pFSH, is well known [34,35]. However, a range of concentrations and commercial brands of rhFSH has been empirically used for IVM of bovine oocytes. This could explain the controversial results found in the literature, with greater blastocyst rates being reported for rhFSH, compared with pFSH, by a study [26], but not by others [25,36]. In fact, recombinant FSH preparations have the same primary structure found in the alpha- and beta- subunits of the endogenous FSH, but may differ significantly in glycosylation [37], and thus in biological activity, half-life, and clearance [38]. As a result, even biosimilar rhFSH may differ in clinical efficacy [39]. In humans, follitropin-alpha was associated with lower estradiol peak concentration, and with greater pregnancy rates after IVF cycles, when compared to follitropin-beta [40]. Coherently, the response-curve to rhFSH during IVM also differs among commercial preparations [41].

In the current study we used follitropin-alpha (Gonal-F), an FSH preparation known to promote bovine oocyte maturation in a dose-dependent manner [41]. However, concentrations over 1 ng/mL, as the one used in our study (7.3 ng/mL), seem to be effective in promoting cumulus expansion and improving blastocyst rates [25,26,35]. Taking into account the IVEP outcomes, our results confirm the hypothesis that pFSH can be replaced by follitropin-alpha, within the dose used, during IVM of bovine oocytes. Moreover, the supplementation with rhFSH during IVM resulted in blastocysts with more trophoblast cells, as well as in a greater proportion of expanded blastocysts at day 7 of IVC, when compared to pFSH. The trophoblast cells are responsible for the Interferon-Tau (IFNT) production and thus play a key

role during maternal recognition of pregnancy [42]. Trophectoderm length is positively associated with IFNT gene expression [43]. Therefore, the greater number of trophoblast cells in blastocysts from rhFSH group could, potentially, result in greater pregnancy rates, which is the ultimate goal of the embryo industry [44]. However, we could not confirm this hypothesis with our data from embryo transfers, and the biological significance of such differences remain to be elucidated, particularly taking into account that there was no difference in the number of cells in the ICM among groups.

The lack of FSH during IVM consistently resulted in poor cumulus expansion and in lower blastocyst rates across our experiments, pointing out the importance of FSH for COC maturation and acquisition of developmental competence by the oocyte, as reported elsewhere [4,25,45]. Some studies found no significant positive effect of FSH during IVM on embryo production or quality [6,46]. However, numerical differences in means suggests that such studies may have been underpowered, highlighting the importance of evaluations on a larger scale, as done in the current study. In this regard, it is also noteworthy that blastocyst rates in our negative control group (-FSH) were only circa 10 to 15% lower than those obtained when IVM took place in the presence of FSH, with either 1% (Exp.1) or 10% FBS (Exp. 2 and 4). One can speculate whether breed could also affect the response to FSH, as in the current study blastocyst rates were over 34% in all groups. In general, blastocyst rates obtained with beef *Bos taurus indicus* breeds, such as the Nelore, are greater than those from *Bos taurus taurus* [47]. Moreover, FSH pre-stimulation before OPU is generally associated with higher embryo rates in *Bos taurus taurus* [48,49], but not in *Bos taurus indicus* [50].

The relatively small reduction in embryo production, even in the lack of proper cumulus expansion, is also coherent with previous evidence that the presence of cumulus cells, but not cumulus expansion, is required for the acquisition of developmental potential by the bovine oocyte [21,25]. Moreover, it confirms that cumulus expansion has little predictive value for the selection of matured oocytes for IVF, as previously observed for bovine [31] and porcine oocytes [51]. Actually, cumulus expansion has an important role during the periovulatory events *in vivo*, as for oocyte retrieval by the fimbriae, which is not required *in vitro*. Similarly, blastocysts produced without FSH presented similar hatching rate, cryotolerance,

ICM cell number, and pregnancy rate, to those from pFSH and rhFSH groups. In this regard, we can hypothesize that the lack of FSH during IVM affect the developmental potential of immature oocytes, but not of embryos that were able to develop up to the blastocyst stage. This is coherent with the previous observation that blastocysts have the same chance of developing into pregnancies after transfer, regardless of having originated from IVEP batches with high or low blastocyst rates [52].

In summary, supplementation of oocyte maturation media with pFSH or follitropin-alpha results in similar blastocyst rates, and thus the latter is an alternative for the former in a commercial IVEP routine. On the other hand, the lack of FSH during IVM results in poor cumulus expansion and in lower blastocyst rate, but has no apparent effect on the developmental potential of the embryos produced.

References

- [1] Luciano AM, Sirard MA. Successful in vitro maturation of oocytes: a matter of follicular differentiation. *Biol Reprod* 2018;98(2):162-169. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox149>.
- [2] Richani D, Gilchrist RB. Approaches to oocyte meiotic arrest in vitro and impact on oocyte developmental competence. *Biol Reprod* 2022;106(2):243-252. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab176>.
- [3] Dieleman SJ, et al. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology* 2002; 57:5-20. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00655-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00655-0).
- [4] Caixeta ES, Machado MF, Ripamonte P, Price C, Buratini J. Effects of FSH on the expression of receptors for oocyte-secreted factors and members of the EGF-like family during in vitro maturation in cattle. *Reprod Fertil Dev* 2013;25(6):890-9. <https://doi.org/10.1071/RD12125>.
- [5] Tetkova A, Susor A, Kubelka M, Nemcova L, Jansova D, Dvoran M, Del Llano E, Holubcova Z, Kalous J. Follicle-stimulating hormone administration affects amino acid metabolism in mammalian oocytes. *Biol Reprod* 2019;101(4):719-732. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz117>.
- [6] Sutton-McDowall ML, Mottershead DG, Gardner DK, Gilchrist RB, Thompson JG. Metabolic differences in bovine cumulus-oocyte complexes matured in vitro in the presence or absence of follicle-stimulating hormone and bone morphogenetic protein 15. *Biol Reprod* 2012;87(4):87. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.102061>.
- [7] Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Cumulus expansion and glucose utilization by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Reproduction* 2004;128(3):313-9. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00225>.
- [8] Murphy B, Mapletoft R, Manns J, Humphrey W. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology* 1984;21(1):117-125. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(84\)90311-X](https://doi.org/10.1016/0093-691X(84)90311-X)
- [9] Lynch SS, Reay P, Bluck M. The extraction and purification of human pituitary follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Acta Endocrinol Suppl* 1988;288:12-9.
- [10] Windl O, Dawson M. Animal prion diseases. *Subcell Biochem* 2012;65:497-516. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5416-4_18.

- [11] Lunenfeld B, Bilger W, Longobardi S, Alam V, D'Hooghe T, Sunkara SK. The Development of Gonadotropins for Clinical Use in the Treatment of Infertility. *Front Endocrinol* 2019;10:429. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00429>.
- [12] Fisch B, Avrech OM, Pinkas H, Neri A, Rufas O, Ovadia J, Loumaye E. Superovulation before IVF by recombinant versus urinary human FSH (combined with a long GnRH analog protocol): a comparative study. *J Assist Reprod Genet* 1995;12:26-31. <https://doi.org/10.1007/BF02214125>.
- [13] Bergh C, Howles CM, Borg K, Hamberger L, Josefsson B, Nilsson L, Wikland M. Recombinant human follicle stimulating hormone (r-hFSH; Gonal-F) versus highly purified urinary FSH (Metrodin HP): results of a randomized comparative study in women undergoing assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 1997;12:2133-9. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.10.2133>.
- [14] Palagiano A, Nesti E, Pace L. FSH: urinary and recombinant. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;115 Suppl 1:S30-3. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2004.01.023>.
- [15] Biffoni M, Cantelmo A, Marcucci I, Martelli F, Suzuki H, Borrelli F, Suzuki K. General pharmacology studies on recombinant human follicle stimulating hormone. *Arzneimittelforschung* 1994;44(9):1096-102.
- [16] Pacchiarotti A, Selman H, Valeri C, Napoletano S, Sbracia M, Antonini G, Biagiotti G, Pacchiarotti A. Ovarian Stimulation Protocol in IVF: An Up-to-Date Review of the Literature. *Curr Pharm Biotechnol* 2016;17(4):303-15. <https://doi.org/10.2174/1389201017666160118103147>.
- [17] Trousdale RK, Yu B, Pollak SV, Husami N, Vidali A, Lustbader JW. Efficacy of native and hyperglycosylated follicle-stimulating hormone analogs for promoting fertility in female mice. *Fertil Steril* 2009;91(1):265-70. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.11.013>.
- [18] Yang S, He X, Niu Y, Hildebrandt TB, Jewgenow K, Goeritz F, Tang X, Chang Y, Zhou Q, Ji W. Ovarian response to gonadotropin stimulation in juvenile rhesus monkeys. *Theriogenology* 2009;72(2):243-50. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.02.019>.
- [19] Viudes-de-Castro MP, Pomares A, Saenz de Juano I Ribes MD, Marco-Jiménez F, Vicente JS. Effect of luteinizing hormone on rabbit ovarian superstimulation and embryo developmental potential. *Theriogenology* 2015;84(3):446-51. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.04.001>.

- [20] Silvestre MA, Alfonso J, García-Mengual E, Salvador I, Duque CC, Molina I. Effect of recombinant human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on in vitro maturation of porcine oocytes evaluated by the subsequent in vitro development of embryos obtained by in vitro fertilization, intracytoplasmic sperm injection, or parthenogenetic activation. *J Anim Sci* 2007;85(5):1156-60. <https://doi.org/10.2527/jas2006-645>.
- [21] Ali A & Sirard MA. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. *Biology of Reproduction* 2002a;66:901–905. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.4.901>.
- [22] Pozzobon SE, Lagares MA, Brum DS, Leivas FG, Rubin MI. Addition of recombinant human growth hormone to in vitro maturation medium of bovine oocytes. *Reprod Domest Anim* 2005;40:19-22. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00547.x>.
- [23] Luciano AM, Franciosi F, Modena SC, Lodde V. Gap Junction-Mediated Communications Regulate Chromatin Remodeling During Bovine Oocyte Growth and Differentiation Through cAMP-Dependent Mechanism(s). *Biol Reprod* 2011;85:1252-1259. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.092858>.
- [24] Marco-Jiménez F, Vicente JS, Viudes-de-Castro MP. Effect of lanosterol on the in vitro maturation in semi-defined culture system of prepubertal ewe oocytes. *Zygote* 2014; 22:50-7. <https://doi.org/10.1017/S096719941100044X>.
- [25] Ali A & Sirard MA. The effects of 17beta-estradiol and protein supplement on the response to purified and recombinant follicle stimulating hormone in bovine oocytes. *Zygote* 2002b;10:65–71. <https://doi.org/10.1017/S0967199402002095>.
- [26] Calder MD, Caveney AN, Smith LC, Watson AJ. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:14. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-14>.
- [27] Wang X, Tsai T, Qiao J, Zhang Z, Feng HL. Impact of gonadotropins on oocyte maturation, fertilization and developmental competence in vitro. *Reprod Fertil Dev* 2014;26(5):752-7. <https://doi.org/10.1071/RD13024>.
- [28] de Oliveira Leme L, Dufort I, Spricigo JF, Braga TF, Sirard MA, Franco MM, Dode MA. Effect of vitrification using the Cryotop method on the gene expression profile of

- in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 2016;85(4):724-33.e1. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.016>.
- [29] Amaral TF, de Grazia JGV, Martinhao LAG, De Col F, Siqueira LGB, Viana JHM, Hansen PJ. Actions of CSF2 and DKK1 on bovine embryo development and pregnancy outcomes are affected by composition of embryo culture medium. *Sci Rep* 2022;12(1):7503. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11447-7>.
- [30] Zullo G, Albero G; Neglia G, De Canditiis C, Bifulco G, Campanile G, Gasparrini B. L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine in vitro-produced embryos. *Theriogenology* 2016;85:688-697. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.008>.
- [31] Russell DF, Baqir S, Bordignon J, Betts DH. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Mol Reprod Dev* 2006;73(10):1255-70. <https://doi.org/10.1002/mrd.20553>.
- [32] Rätty M, Ketoja E, Pitkänen T, Ahola V, Kananen K, Peippo J. In vitro maturation supplements affect developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes and embryo quality after vitrification. *Cryobiology* 2011;63(3):245-55. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.09.134>.
- [33] Momozawa K. Usefulness of modified Medium RD as a chemically defined medium for in vitro maturation of bovine oocytes. *Reprod Med Biol* 2020;19(4):365-371. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12337>.
- [34] van Tol HT, van Eijk MJ, Mummery CL, van den Hurk R, Bevers MM. Influence of FSH and hCG on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. *Mol Reprod Dev* 1996;45(2):218-24. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199610\)45:2<218::AID-MRD15>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199610)45:2<218::AID-MRD15>3.0.CO;2-X).
- [35] Bevers MM, Dieleman SJ, van den Hurk R, Izadyar F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology* 1997;47(1):13-22. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(96\)00335-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00335-4)
- [36] Accardo C, Dattena M, Pilichi S, Mara L, Chessa B, Cappai P. Effect of recombinant human FSH and LH on in vitro maturation of sheep oocytes; embryo development and viability. *Anim Reprod Sci* 2004;81(1-2):77-86. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.10.004>.

- [37] Dias JA, Ulloa-Aguirre A. New Human Follitropin Preparations: How Glycan Structural Differences May Affect Biochemical and Biological Function and Clinical Effect. *Front Endocrinol* 2021;12:636038. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.636038>.
- [38] Koechling W, Plaksin D, Croston GE, Jeppesen JV, Macklon KT, Andersen CY. Comparative pharmacology of a new recombinant FSH expressed by a human cell line. *Endocr Connect* 2017;6(5):297-305. <https://doi.org/10.1530/EC-17-0067>.
- [39] Orvieto R, Seifer DB. Biosimilar FSH preparations- are they identical twins or just siblings? *Reprod Biol Endocrinol* 2016;14(1):32. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0167-8>.
- [40] Orvieto R, Nahum R, Rabinson J, Ashkenazi J, Anteby EY, Meltzer S. Follitropin-alpha (Gonal-F) versus follitropin-beta (Puregon) in controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization: is there any difference? *Fertil Steril* 2009;91(4 Suppl):1522-5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.112>.
- [41] Wang X, Tsai T, Qiao J, Zhang Z, Feng HL. Impact of gonadotropins on oocyte maturation, fertilisation and developmental competence in vitro. *Reprod Fertil Dev* 2014;26(5):752-7. <https://doi.org/10.1071/RD13024>.
- [42] Demmers KJ, Derecka K, Flint A. Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction* 2001;121(1):41-9. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210041>.
- [43] Shorten PR, Ledgard AM, Donnison M, Pfeffer PL, McDonald RM, Berg DK. A mathematical model of the interaction between bovine blastocyst developmental stage and progesterone-stimulated uterine factors on differential embryonic development observed on Day 15 of gestation. *J Dairy Sci* 2018;101(1):736-751. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12845>.
- [44] Hansen PJ. The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle-why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it? *J Anim Sci* 2020;98(11):skaa288. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa288>.
- [45] Kobayashi K, Yamashita S, Hoshi H. Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha on in vitro maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. *J Reprod Fertil* 1994;100(2):439-46. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1000439>.

- [46] Choi YH, Carnevale EM, Seidel GE Jr, Squire EL. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology* 2001;56(4):661-70. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00597-0](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00597-0).
- [47] Watanabe YF, Souza AH, Mingoti RD, Ferreira RM, Batista EOS, Dayan A, Watanabe O, Meirelles FV, Nogueira MFG, Ferraz JBS, Baruselli PS. Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with *in vitro* embryo production and field fertility following embryo transfer. *Anim Reprod* 2017;14:635-644. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR1008>
- [48] Vieira LM, Rodrigues CA, Castro Netto A, Guerreiro BM, Silveira CR, Moreira RJ, Sá Filho MF, Bó GA, Mapletoft RJ, Baruselli PS. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve *in vitro* embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology* 2014;82(2):318-24. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.04.013.
- [49] Demetrio DGB, Benedetti E, Demetrio CGB, Fonseca J, Oliveira M, Magalhaes A, Dos Santos RM. How can we improve embryo production and pregnancy outcomes of Holstein embryos produced *in vitro*? (12 years of practical results at a California dairy farm). *Anim Reprod* 2020;17(3):e20200053. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0053>.
- [50] Monteiro FM, Ferreira MM, Potiens JR, Eberhardt BG, Trinca LA, Barros CM. Influence of superovulatory protocols on *in vitro* production of Nellore (*Bos indicus*) embryos. *Reprod Domest Anim*. 2010;45(5):860-4. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01399.x>.
- [51] Redel BK, Spate LD, Murphy CN, Roberts RM, Prather RS. Neither gonadotropin nor cumulus cell expansion is needed for the maturation of competent porcine oocytes *in vitro*. *Biol Reprod*.2021;105:533-542. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab090>.
- [52] Feres LF, Siqueira LGB, Palhao MP, Dos Santos LL, Brandao FZ, Viana JHM. Likelihood of pregnancy after the transfer of embryos derived from follicle aspiration and *in vitro* embryo production sessions with different relative efficiencies. *Anim Reprod Sci* 2018;193:165-170. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.04.065>.

Tables

Table 1. IVEP outcomes and subsequent hatching rates of fresh or vitrified blastocysts from bovine COC submitted to IVM in the absence (-FSH) or in the presence of porcine (pFSH) or recombinant human FSH (rhFSH).

Endpoint [% (n)]	Group			P-Value
	-FSH	pFSH	rhFSH	
IVEP				
Cleavage	77.1% (730/947)	77.2% (658/852)	79.6% (790/992)	P=0.3157
Blastocyst rate (D6)	19.5% (185/947)	21.5% (183/852)	22.3% (221/992)	P=0.3178
Blastocyst rate (D7)	34.8% ^b (330/947)	39.3% ^a (335/852)	40.6% ^a (403/992)	P=0.0244
Hatching				
Fresh (D10)	74.5% (82/110)	79.0% (94/119)	70.1% (101/144)	P=0.2621
Vitrified/thawed	75.0% (54/72)	69.6% (48/69)	73.2% (52/71)	P=0.7623

^{a,b} Values followed by different superscripts, in the same line, differ (Chi-squared, P<0.05)

Table 2. Number of total, trophoblast and inner cell mass (ICM) cells, as well as the ICM/total ratio, in expanded blastocysts produced from bovine COC submitted to IVM in the absence (-FSH) or in the presence of porcine (pFSH) or recombinant human FSH (rhFSH).

Group	n	Total	Trophoblast	ICM	ICM/Total (%)
-FSH	21	132.2 ^b ±7.3	80.0 ^b ±5.7	52.2±3.6	39.9 ^a ±2.5
pFSH	17	134.7 ^{ab} ±6.6	87.4 ^b ±5.1	47.3±3.4	35.2 ^{ab} ±2.0
rhFSH	15	153.3 ^a ±7.7	110.3 ^a ±5.6	43.0±4.0	27.6 ^b ±1.9
P-value		P=0.0383	P=0.0002	P=0.3231	P=0.0013

^{a,b} Values followed by different superscripts, in the same line, differ (P<0.05)

Table 3. IVEP outcomes and subsequent pregnancy rates of blastocysts produced from bovine COC submitted to IVM in the absence (-FSH) or in the presence of porcine (pFSH) or recombinant human FSH (rhFSH), and fertilized with Y-sorted semen.

Endpoint [% (n)]	Group			P-Value
	-FSH	pFSH	rhFSH	
Cleavage	71.6% ^b (1,141/1,594)	76.0% ^a (2,686/3,536)	75.1% ^a (1,177/1,567)	P=0.0035
Blastocyst rate (D7)	34.3% ^b (546/1,594)	38.1% ^a (1,347/3,536)	39.5% ^a (611/1,567)	P=0.0102
Early blastocysts (%)	13.5% ^a (46/342)	14.6% ^a (123/841)	8.6% ^b (31/359)	P=0.0175
Expanded blast. (%)	73.1% ^a (250/342)	66.1% ^b (556/841)	73.5% ^a (264/359)	P=0.0092
Pregnancy rate	56.0% (28/50)	43.8% (28/64)	33.3% (12/36)	P=0.1080

^{a,b} Values followed by different superscripts, in the same line, differ (Chi-squared, P<0.05)

Figure captions

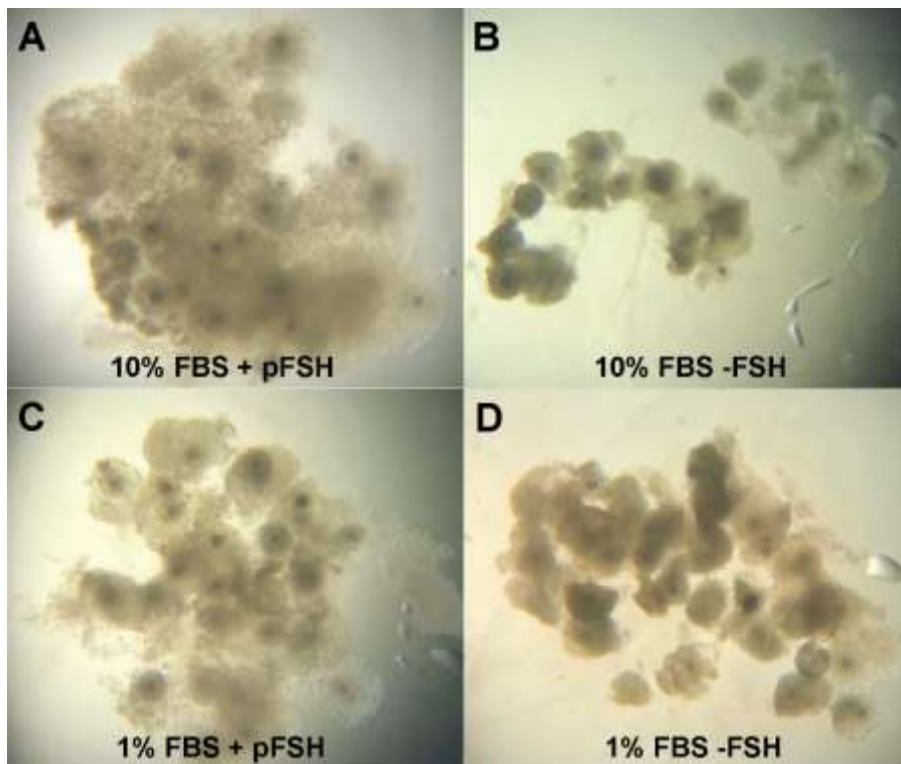


Figure 1 A-D. Expansion of the cumulus cells in bovine COC after 22 h of IVM, according to group. A and B, COC submitted to IVM in the presence of 10% FBS; A and C, COC undergoing IVM in the presence of pFSH.

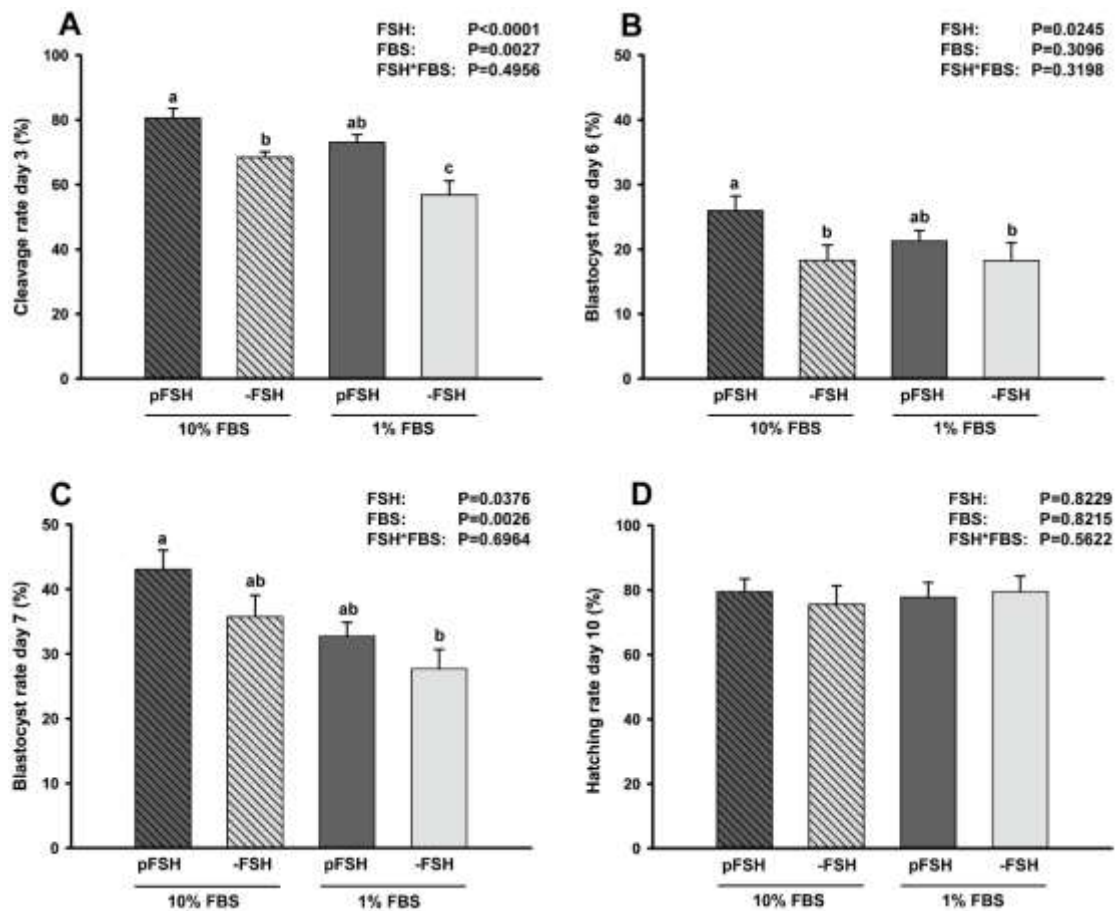


Figure 2 A-D. IVEP outcomes for bovine COC submitted to IVM in the presence of either 10% or 1% FBS, and either without (-FSH) or with pFSH. A) Cleavage rate; B) Blastocyst rate at day 6 of IVC; C) Blastocyst rate at day 7 of IVC; D) Hatching rate at day 10 of IVC. P values for the effects of FHS (-FSH or pFSH), FBS (10% or 1%), and their interaction, are shown in the upper right side of each picture. ^{a,b,c}: P<0.05

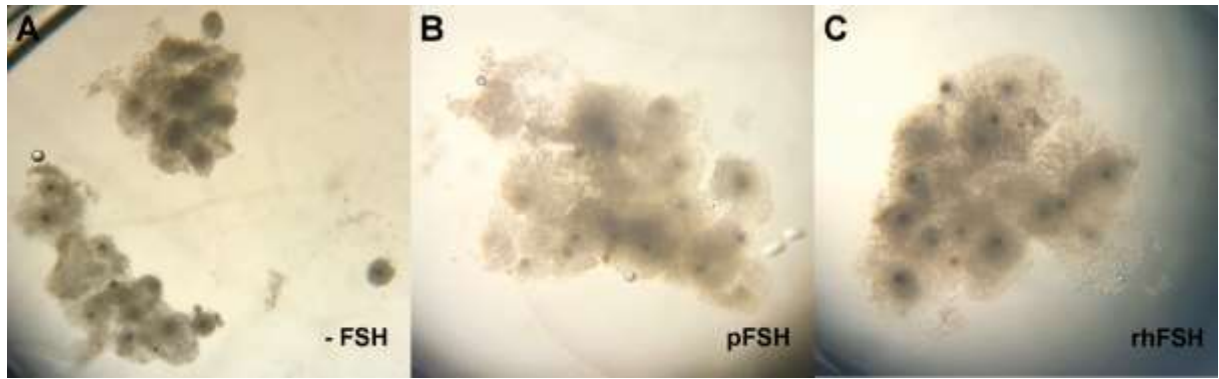


Figure 3 A-C. Expansion of the cumulus cells in bovine COC after 22 h of IVM, according to group. A) -FSH; B) pFSH; C) rhFSH.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi contemplado com apoio financeiro do Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP) do Departamento de Pós-Graduação (DPG), edital 0001/2022.

O autor agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio através da concessão de bolsa de estudos durante todo o mestrado.

Este projeto foi contemplado pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), com um apoio à participação de evento, para exposição do resumo no 19th International Congress on Animal Reproduction (ICAR), em Bologna, Itália, através do edital 07/2022.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso estudo demonstrou que a suplementação de meios de maturação *in vitro* com pFSH ou folitropina-alfa (rhFSH) resultam em taxas de blastocisto semelhantes e, portanto, o rhFSH é uma alternativa ao pFSH em uma rotina comercial de produção *in vitro* de embriões. A produção de gonadotrofinas a base da tecnologia recombinante tem crescido ao longo dos anos. Dessa forma, estudos como o nosso demonstram a eficácia dessas moléculas com o intuito de encontrar alternativas e viabilizar o seu uso a nível comercial, sem prejudicar a qualidade e os resultados da produção.

ANEXOS

1. Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética

	<p>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA/Cenargen)</p> 
<p>CERTIFICADO</p> <p>001/2022</p>	

Certificamos que o adendo a proposta intitulada "Uso do FSH recombinante humano na produção in vitro de embriões bovinos", registrada com o número Protocolo CEUA N° 001/2022, sob a responsabilidade de João Henrique Moreira Viana, que envolve manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilio Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA (CEUA/CENARGEN) em reunião ordinária realizada em 08 de março de 2022.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/05/2022 a 31/08/2022
Espécie/linhagem/raça	Bovina/ Nelore
N° de animais	300
Peso/Idade	200 a 400 kg / 2 a 5 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Alta Floresta - MT



Coordenação CEUA/Cenargen
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

2. Resumos submetidos à congressos

19th International Congress on Animal Reproduction (ICAR 2020+2)

USE OF HUMAN RECOMBINANT FSH FOR IN VITRO EMBRYO PRODUCTION IN CATTLE

L.Martins³, L. Martinhão³, I. Garcia⁴, D. Ribas⁴, J.G. Grázia¹, R. Figueiredo², J.H. Viana²

¹Apoyar Biotech, Juiz de Fora, MG, Brasil

²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil

³Universidade de Brasília, Brasília, DF

⁴Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, MT, Brasil

BACKGROUND-AIM

The recombinant human FSH (rhFSH) has been used during in vitro maturation (IVM) of cattle oocytes as an alternative to replace FSH obtained from porcine pituitary (pFSH) and available for veterinary use. Among the advantages of the rhFSH are the lower variation in biological activity and the lack of sanitary risks associated with the use of protein extracts from other species. However, few studies have directly compared the efficiency of rhFSH and pFSH for IVM in cattle. In this study we evaluated in vitro embryo production outcomes using both sources of FSH.

METHODS

Bovine cumulus-oocyte complexes (COC, n=945) recovered from slaughterhouse ovaries and morphologically classified as grades I or II were used. The COC were allocated into three groups, which were IVM in TCM 199 medium: (1) without FSH (-FSH n=315), (2) with 0.5 µg/mL pFSH (Folltropin-V, Vetoquinol, n=315), or (3) with 0.1 UI/mL rhFSH (Gonal, Merck, n=315), under the same culture conditions (38.5°C, 5% CO₂). Cumulus expansion was addressed after 22 h of IVM and subjectively graded as poor, average, or good. Semen from a sire with known fertility was used for in vitro fertilization. The presumptive zygotes were cultured under low oxygen tension (5% CO₂ and 5% O₂, 38,5°C). Cleavage, blastocyst, and hatching rates were evaluated at days 3, 7, and 10 of culture, respectively. Embryo production data

were analyzed using the Proc GLIMMIX of the SAS (SAS Institute), and cumulus expansion using the Kruskal-Wallis test.

RESULTS

As expected, cumulus expansion grade was greater ($P < 0.05$) in hatching rates among groups, which only varied ($P = 0.0024$) according to replica. There was a significant effect of treatment, but not of replica or treatment*replica, on cleavage and blastocyst rates. The cleavage (day 3) rate was similar ($P = 0.7339$) between groups -FSH and pFSH, but in both groups rates were lower ($P < 0.05$) when compared with rhFSH (71.5% and 70.0% vs. 80.4; respectively. The blastocyst rate was affected ($P < 0.05$) by the source of FSH (34.6%^a, 38.0%^{ab} and 46.0%^b for -FSH, pFSH and rhFSH, respectively). However, there was no difference ($P > 0.05$) in hatching rates among groups, which only varied ($P = 0.0024$) according to replica.

CONCLUSIONS

The rhFSH improve blastocyst rates and therefore is an alternative to pFSH for IVM of cattle COC.

**XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões
(SBTE 2022)**

**CRYOTOLERANCE OF IN VITRO PRODUCED BOVINE EMBRYOS ORIGINATED
FROM OOCYTES MATURED IN MEDIUM SUPPLEMENTED WITH
RECOMBINANT HUMAN FSH**

Letícia Prates Martins^{1,1}, Luany Alves Galvão Martinhão¹, Ismael Nunes Garcia⁴,
Dhonata Nunes Ribas⁴, João Gabriel Viana de Grázia³, Ricardo Alamino Figueiredo²,
João Henrique Moreira Viana²

¹UnB - Universidade de Brasília (Asa Norte - Brasília DF), ²Cenargen - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Parque Estação Biológica - Asa Norte, Brasília DF), ³Apoyar - Apoyar FIV Biotech (Juiz de Fora MG), ⁴UNEMAT - Universidade do Estado do Mato Grosso (Alta Floresta MT)

The recombinant human FSH (rhFSH) has been used during in vitro maturation (IVM) of cattle oocytes as an alternative to the FSH obtained from porcine pituitary (pFSH). The rhFSH show less variation on biological activity, and lacks the sanitary risks associated with the use of protein extracts obtained from other species. However, few studies have compared the efficiency of rhFSH and pFSH considering not only the results of IVM, but also subsequent embryo quality. The aim of this study was to evaluate the cryotolerance of embryos produced in vitro after IVM with rhFSH. Cumulus-oocyte complexes (COC, n=2,040) recovered from slaughterhouse ovaries and morphologically classified as grades I or II were used. The COC were randomly allocated into three groups, which were IVM in TCM199: 1) without FSH (-FSH, n=680); 2) with 0.5 µg/mL pFSH (pFSH, Folltropin-V, Vetoquinol, n=680); or 3) with 0.1 UI/mL rhFSH (rhFSH, Gonol, Merck, n=680), all groups in the same culture conditions (38.5°C, 5% CO₂). Cumulus expansion was evaluated at 22 h of IVM and subjectively classified as poor, intermediate, or good. Sperm from a single sire with known fertility was used for in vitro fertilization. The presumptive zygotes were cultured under low oxygen concentration (5% CO₂, 5% O₂, and 90% N₂, at 38.5°C). The cleavage, blastocyst and hatching rates were addressed at days 3, 7, and 10 of culture, respectively. At the day 7, a subset of grade I expanded blastocysts (n=54,

69, and 71 embryos from groups -FSH, pFSH and rhFSH) were cryopreserved by vitrification, stored in liquid nitrogen, and then thawed and in vitro cultured under low oxygen concentrations. Hatching rates were evaluated after 72h. Data were evaluated by the Chi-squared method using the SAS software (SAS Institute). Cleavage and blastocyst rates, but not hatching, were higher in the rhFSH, compared with -FSH and pFSH groups (80.4% and 46.3% vs 71.5% and 34.6%, and 70.0% and 38.0%, respectively, $P=0.0069$ and $P=0.0207$). However, there was no difference in hatching rates after vitrification among groups (75.0%, 72.5% and 73.2%, $P=0.8875$, for groups -FSH, pFSH and rhFSH, respectively). In summary, there is no evidence that the presence or the source of FSH (porcine or recombinant human) during IVM affect subsequent embryo cryotolerance. Acknowledgements: CAPES, DPG UnB, and FAPDF.

THE SOURCE OF FSH USE DURING IN VITRO MATURATION OF BOVINE CUMULUS-OOCYTE COMPLEXES AFFECTS BOTH EMBRYO PRODUCTION AND MORPHOLOGICAL QUALITY

LP Martins¹, LAG Martinhão¹, IN Garcia², DN Ribas², JGV Grázia³, OAC Faria¹, RA Figueiredo⁴, JHM Viana^{*4}

¹University of Brasilia, Brasília, Distrito Federal, Brazil, ²State University of Mato Grosso, Alta Floresta, Mato Grosso, Brazil, ³FIVX Apoyar Biotech, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil, ⁴Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brasil

The recombinant human FSH (rhFSH) has been empirically used to replace porcine FSH (pFSH) during in vitro maturation (IVM) of cumulus-oocyte complexes (COC) recovered from cattle. However, few studies have directly compared the efficiency of these two sources of FSH in a commercial in vitro embryo production (IVEP) program. The aim of this study was to evaluate embryo production and quality when either rhFSH or pFSH are used during IVM. Grade I COC (n=720) recovered from slaughterhouse ovaries were allocated into three groups, in which IVM was performed in TCM199 medium: 1) without FSH (-FSH, n=240); 2) supplemented with 0.5 µg/mL pFSH (Folltropin-V, Vetoquinol, n=240); or 3) supplemented with 0.1 UI/mL rhFSH (Gonal, Merck, n=240), all in the same culture conditions (38.5°C, 5%CO₂). The cumulus expansion was addressed at 22 h of IVM and subjectively scored as poor, fair, or good. Semen from a single sire with known fertility as used for in vitro fertilization. The presumptive zygotes were in vitro cultured under low oxygen atmosphere (5%CO₂ and 5%O₂, 38.5°C). At the seventh day of embryo culture, the blastocyst rate was evaluated and a subset of the expanded blastocysts grade I (BX I, n=21, 17 and 15 in groups -FSH, pFSH and rhFSH, respectively) were submitted to differential staining using Hoechst 33342 (total cell number) and propidium iodide (trophoblast cells). Data were analyzed using the PROC NPAR or the Proc Glimmix of the SAS software (SAS Institute). COC expansion was similar (P>0.05) between

pFSH and rhFSH, and in both groups it was greater than in -FSH ($P < 0.0001$). The blastocyst rate, however, was greater in rhFSH compared with -FSH and pFSH (46.3% vs 34.6% and 38.0%, respectively; $P = 0.0207$). The BX from rhFSH presented more total cells than those from -FSH (153.3 ± 29.4 vs 132.2 ± 31.0 , respectively; $P = 0.0137$) and more trophoblast cells than those from both -FSH and pFSH (110.3 ± 24.1 vs. 80.0 ± 25.9 and 87.4 ± 22.4 , respectively; $P = 0.0030$). There was no difference in the number of cells in the inner cell mass (ICM) among groups (52.2 ± 15.6 , 47.3 ± 15.3 and 43.0 ± 15.5 for -FSH, pFSH and rhFSH, respectively, $P > 0.05$), resulting in a lower ICM/total cell proportion in the rhFSH group, compared with -FSH and pFSH ($28.0 \pm 9.5\%$ vs. $39.5 \pm 9.5\%$ and $35.1 \pm 10.4\%$, respectively; $P = 0.0237$). In summary, pFSH can be replaced by rhFSH during IVM of cattle COC, improving IVEP and embryo quality. ACKNOWLEDGEMENTS: CAPES, DPG UnB and FAPDF. KEYWORDS: Use recombinant gonadotropin; in vitro embryo production; cattle