

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

LUÍS FERNANDO SCHÜTZ

**EVIDÊNCIAS DE ATIVIDADE DA VIA METABÓLICA DA FRUTOSE EM
NEONATOS BOVINOS DERIVADOS DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* E
IN VIVO E SEU EFEITO NO PERÍODO NEONATAL IMEDIATO**

LAGES – SC

2012

LUÍS FERNANDO SCHÜTZ

**EVIDÊNCIAS DE ATIVIDADE DA VIA METABÓLICA DA FRUTOSE EM
NEONATOS BOVINOS DERIVADOS DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* E
IN VIVO E SEU EFEITO NO PERÍODO NEONATAL IMEDIATO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Área de Concentração em Reprodução Animal, no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV – UDESC), como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Marcelo Bertolini
Co-orientadora: Fabiana Forell

LAGES-SC

2012

LUÍS FERNANDO SCHÜTZ

**EVIDÊNCIAS DE ATIVIDADE DA VIA METABÓLICA DA FRUTOSE EM
NEONATOS BOVINOS DERIVADOS DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* E
IN VIVO E SEU EFEITO NO PERÍODO NEONATAL IMEDIATO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Área de Concentração em Reprodução Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV – UDESC), como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Orientador:

Professor Dr. Marcelo Bertolini
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Membros:

Professor Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Professor Dr. Luiz Cláudio Miletto
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Professor Dr. José Luiz Rodrigues
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Lages, SC, 27 de Abril de 2012.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que abençoa minha vida.

À minha amada esposa, Sheline, pessoa inestimável em minha vida, sempre me apoiando e me fazendo muito feliz. Ao teu lado, torno-me mais forte para perseguir meus sonhos.

Aos meus pais, Luiz Alfredo e Maria Elisa, que, com muito amor, me incentivam sempre a buscar o que desejo.

Aos meus irmãos, Felipe e Anelise, pelo companheirismo, carinho e incentivo e aos meus cunhados, Manuela e Henrique, que fazem meus irmãos felizes e são grandes amigos.

À Marilene, amiga que sempre me apoia.

À família Franceschi, Adi, Pierina, Júnior, Sheila e Janine, por todo o suporte e a amizade e ao meu afilhado, Bernardo, que me dá muitos momentos de alegria.

Ao meu grande tutor, Marcelo Bertolini, que transmite preciosos ensinamentos com muita paixão e serve de inspiração para que eu tente seguir os caminhos da docência e da pesquisa.

Ao meu amigo Fabiano Zago, que me recebeu como a um irmão em Lages, me ajudou imensamente durante o mestrado e tornou minha estadia muito mais divertida no planalto serrano catarinense, e à sua família, Adriana, Arthur e Enzo, que me ofereceram sua amizade.

Aos meus amigos e colegas de mestrado Daniel Schmitt, Diego Fernandes e Luís Carlos Bordin, que me auxiliaram na execução do experimento e foram companheiros de estudo, de jantas e de boas conversas.

Aos meus amigos e colegas Kaio, Saul e Leonardo, que me receberam muito bem no Ceará, me fizeram sentir em casa e foram fundamentais para a execução deste trabalho.

Ao amigo Valério com quem convivi e aprendi durante o mestrado.

Aos amigos Fabiana, Bira, Julia e Gabriela que me apoiaram intensamente neste trabalho.

À professora Luciana Relly Bertolini pela valorosa ajuda na execução deste trabalho e ao restante da família Bertolini, Marianna, Isabella, Catarina e Lorenzo pela amizade.

Aos colegas e amigos Luís Henrique, Pedro, Jamir e Mônica, cujo apoio foi simplesmente essencial para este trabalho acontecer.

Aos colegas e amigos da UNIFOR Victor, Cristiano, Felipe, Juliana, Karol, Maurício, Igor, Neto, Débora, Priscila, Raquel e Conceição, que me apoiaram na condução deste trabalho.

Aos amigos Cristine, Rafael e família Araujo, que por diversas vezes me receberam em sua casa durante o mestrado e sempre me ofereceram sua amizade e apoio.

À UDESC e seus professores pelos acolhimento e ensinamentos.

À CAPES pelo suporte financeiro durante o período do mestrado.

À EPAGRI e seus funcionários, que me apoiaram durante a execução deste trabalho.

RESUMO

Neonatos bovinos derivados de fecundação *in vitro* (FIV) frequentemente apresentam dificuldades de adaptação à vida *ex utero*, estando o excesso de peso ao nascer associado a elevadas concentrações plasmáticas de frutose em alguns bezerros de FIV. A hipótese deste trabalho é que a via metabólica da frutose é ativa ao nascimento, podendo ser benéfica ou prejudicial à sobrevivência neonatal, dependendo da função respiratória do neonato. Para investigar esta hipótese, quatro neonatos bovinos derivados de embriões produzidos *in vitro* e cinco de embriões *in vivo* foram avaliados quanto à normalidade morfo-fisiológica e clínica ao nascimento, e quanto a sinais de adaptação ao ambiente extrauterino nas primeiras 24 h de vida. Ao nascimento, os animais foram submetidos à análise de expressão gênica de enzimas da via metabólica da frutose e à coleta de fluidos fetais e de urina para mensuração da frutose. Durante o período do parto até as 24 h de vida, foram avaliados os sinais clínicos, as concentrações plasmáticas de substratos metabólicos, a bioquímica sanguínea, a hemogasometria e o hemograma. As características físicas, clínicas e comportamentais dos neonatos foram comparadas aos parâmetros fisiológicos, bioquímicos, metabólicos e moleculares avaliados ao parto e nas primeiras 24 h de vida para a determinação de alterações fisiológicas e inter-relações de significância biológica entre os grupos experimentais. Os neonatos bovinos derivados de FIV foram mais pesados e maiores ao nascimento, apresentando uma menor frequência respiratória e uma menor resposta termoregulatória que animais SOV, não havendo diferenças nos níveis de frutose, glicose e lactato entre os grupos. Não obstante, os parâmetros fisiológicos e metabólicos ao nascimento foram, em geral, amplamente similares e normais entre os grupos experimentais. Porém, ao longo das primeiras 24 h, os neonatos de FIV apresentaram características fisiológicas, metabólicas, bioquímicas, hemogasométricas, e hematológicas indicativas de uma maior dificuldade de adaptação à vida *ex utero*, em especial nas primeiras 4 a 6 h após de vida. As principais diferenças indicaram que animais maiores, em especial os de FIV, apresentaram maior dificuldade para a manutenção da normóxia, por uma hematose menos eficiente, mudanças metabólicas e uma elevação de substratos metabólicos (principalmente o lactato), e uma tendência à acidose com normalização compensatória do balanço ácido-base, principalmente nas primeiras 6 h de vida. O papel fisiológico e metabólico da frutose foi aparente, mas não conclusivo.

Palavras-chave: Neonatos bovinos, fecundação *in vitro*, frutose, traços físicos, equilíbrio ácido-base, expressão gênica.

ABSTRACT

Newborn calves derived from *in vitro* fertilization (IVF) procedures often have difficulties to adapt to life *ex utero*, with high birth weights usually associated with high plasma fructose levels in some *in vitro*-produced calves. We hypothesize that the fructose metabolic pathway is active at birth, with the fructosemia levels being either detrimental or beneficial to animal survival depending on the respiratory function in the neonate. To investigate this hypothesis, four and five newborn calves derived from *in vitro*- and *in vivo*-produced embryos were evaluated for morpho-physiological and clinical normality at birth, and for subsequent signs adaptation to life *ex utero* in the first 24 h of life. At birth, animals were subjected to gene expression analyses for key enzymes in the fructose metabolic pathway and to the collection of fetal fluids and urine for fructose analysis. In addition, during the period between birth and 24 h of life, animals were evaluated for clinical signs, plasma concentrations of metabolic substrates, blood chemistry, hemogasometry, and hematologic parameters. Neonatal physical, clinical, and behavioral traits were compared with physiological, biochemical, metabolic, and molecular findings observed at birth and in the first 24 h of life for the determination of physiological alterations and relationships of biological significance between the experimental groups. *In vitro*-derived newborn calves were heavier and larger at birth, having lower respiratory rate and thermoregulatory response than *in vivo*-derived controls, with no significant differences in fructose, glucose and lactate levels between groups. Nevertheless, physiological and metabolic findings at birth, in general, were widely similar and normal between groups. However, during the first 24 h of life, IVF-derived calves showed physiological, metabolic, biochemical, hemogasometric, and hematologic features indicative of a lower adaptation to life *ex utero*, particularly in the first 4 to 6 h of life. The main differences indicated that larger animals, mainly the IVF-derived calves, had more difficulties to maintain plasma oxygen levels, likely due to a less efficient hematoses, with evidence of a metabolic shift and elevation of metabolic substrates (mostly lactate), and a trend for acidosis followed by a compensatory normalization of the acid-base balance, predominantly in the first 6 h of life. The physiological and metabolic role of fructose was apparent, but not conclusive.

Keywords: Newborn calves, *in vitro* fertilization, fructose, physical traits, acid-base balance, gene expression.

LISTA DE FIGURAS

<i>Figure 1. Simplified diagram of the intersection between the fructose metabolic pathway and the glycolytic pathway, with the presentation of the liver enzymes used for the gene expression analyses and the main energy substrates analyzed in the newborn plasma (highlight) of in vivo- and in vitro-derived calves.....</i>	<i>46</i>
<i>Figure 2. Enlarged umbilicus in an in vitro-derived newborn calf immediately after delivery.....</i>	<i>52</i>
<i>Figure 3. Relative abundance of transcripts for key enzymes related to the fructose metabolic pathway in the liver of IVF- and SOV-derived calves upon birth.....</i>	<i>54</i>
<i>Figure 4. Body temperature (BT, °C), heart rate (HR, b.p.m.) and respiratory rate (RR, br.p.m.) in IVF- and SOV-derived newborn calves at five minutes after birth.....</i>	<i>56</i>
<i>Figure 5. Components of the lipid metabolism in the plasma of IVF- and SOV-derived newborn calves at five minutes after birth.....</i>	<i>59</i>
<i>Figure 6. D-Glucose, D-Fructose and L-lactate plasma concentrations during the first 24 h of life.....</i>	<i>61</i>
<i>Figure 7. Mean values of vital signs of in vitro- and in vivo-derived newborn calves during the first 24 h of life.....</i>	<i>63</i>
<i>Figure 8. Mean values for blood gases, acid base parameters and electrolyte concentrations during the 6 first hours of life of newborn calves.....</i>	<i>66</i>

LISTA DE TABELAS

<i>Table 1. Genes of interest, primer DNA sequences and Gene Bank accession numbers for genes analyzed in liver samples from in vivo- and in vitro-derived newborn calves.....</i>	<i>50</i>
<i>Table 2. Physical and behavioral characteristics of in vivo- (SOV) and in vitro- (IVF) derived newborn calves upon birth.....</i>	<i>52</i>
<i>Table 3. Concentrations of D-Fructose, D-glucose and L-lactate in term fetal fluids collected at parturition, in neonatal plasma 5 min after birth, and in first urine.....</i>	<i>53</i>
<i>Table 4. Blood gases, acid-base balance and electrolyte concentrations in IVF- and SOV-derived newborn calves upon birth.....</i>	<i>55</i>
<i>Table 5. Concentrations of plasma components indicative of liver, muscle and kidney functions in IVF- and SOV-derived newborn calves upon birth.....</i>	<i>57</i>
<i>Table 6. Hematologic parameters in IVF- and SOV-derived newborn calves upon birth.....</i>	<i>58</i>
<i>Table 7. Plasma concentrations of D-Fructose, D-glucose and L-lactate in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life.....</i>	<i>60</i>
<i>Table 8. Vital signs in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life.....</i>	<i>64</i>
<i>Table 9. Concentration of blood gases and acid-base balance in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life.....</i>	<i>67</i>
<i>Table 10. Plasma electrolyte concentrations in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life.....</i>	<i>68</i>
<i>Table 11. Concentrations of plasma components indicative of liver function in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life.....</i>	<i>69</i>
<i>Table 12. Concentrations of hepatic enzymes in plasma indicative of liver function in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life.....</i>	<i>70</i>
<i>Table 13. Concentrations of creatinine phosphokinase (CPK) in plasma indicative of muscle function in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life.....</i>	<i>70</i>
<i>Table 14. Concentrations of plasma components indicative of kidney function in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life</i>	<i>71</i>
<i>Table 15. Erythrogram values in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life</i>	<i>72</i>

<i>Table 16. Red blood cell parameters in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life</i>	<i>73</i>
<i>Table 17. White blood cell in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life</i>	<i>74</i>
<i>Table 18. Platelet counts in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life</i>	<i>75</i>
<i>Table 19. Plasma concentrations of components of the lipid metabolism in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life</i>	<i>76</i>

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Grau Celsius

^{13}C - Isótopo 13 do carbono (Carbono 13)

ALT - Alanina transaminase (*Alanine transaminase*)

AST - Aspartato transaminase (*Aspartate transaminase*)

BE - Excesso de base (*Base excess*)

bLP - Lactogênio placentário bovino

BSA - Albumina sérica bovina (*Bovine serum albumin*)

Ca^{+2} - Íon cálcio

Cl^- - Íon cloro

CIV - Cultivo *in vitro*

CO_2 - Dióxido de carbono

CCO - Complexos *cumulus*-oócito

COC - *Cumulus-oocyte complexes*

CPK - Creatina fosfoquinase (*Creatine phosphokinase*)

FIV - Fecundação *in vitro*

FM - Membranas fetais (*Fetal membranes*)

FTET – Transferência de embriões em tempo fixo (*Fixed-time embryo transfer*)

GAP - Gliceraldeído 3-fosfato (*Glyceraldehyde 3-phosphate*)

GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)

GGT - Gama glutamil transferase (*Gamma glutamyl transferase*)

GLUT - Transportador de glicose sódio-independente

Hb - Hemoglobina

HCO_3^- - Íon bicarbonato

HDL - Lipoproteína de alta densidade (*High-density lipoprotein*)

IM - Intra-muscular

IVF - *In vitro fertilization*

IVM - *In vitro maturation*

IVP - *In vitro production*

K^+ - Íon potássio

LDH-A - Lactato desidrogenase A (*Lactate dehydrogenase A*)

LDH-B - Lactato desidrogenase B (*Lactate dehydrogenase B*)

LDL - Lipoproteína de baixa densidade (*Low-density lipoprotein*)

LOS - *Large offspring syndrome*

MCH - Hemoglobina corpuscular média (*Mean corpuscular hemoglobin*)

MCHC - Concentração de hemoglobina corpuscular média (*Mean corpuscular hemoglobin concentration*)

MCV - Volume corpuscular médio (*Mean corpuscular volume*)

MIV - Maturação *in vitro*

Na⁺ - Íon sódio

O₂ - Gás oxigênio

OPU – *Ovum pick-up*

pCO₂ - Pressão parcial de dióxido de carbono

PCR - Reação em cadeia da polymerase (*Polymerase chain reaction*)

PCV - Hematócrito (*Packed cell volume*)

PGF_{2α} - Prostaglandina F2α

PIV - Produção *in vitro*

pO₂ - Pressão parcial de oxigênio

PO₄⁻ - Íon fosfato

PSPB - Proteína B específica de gestação de bovinos (*Pregnancy-specific protein B*)

PVA - Álcool polivinílico (*Polyvinyl alcohol*)

RBC - Eritrócitos totais (*Total red blood cells*)

RDW - *Red blood cell distribution width*

SCNT - *Somatic cell nuclear transfer*

SOFaaci - Fluido sintético de oviduto suplementado com aminoácidos, citrato de sódio e mioinositol (*Synthetic Oviductal Fluid supplemented with amino acids, sodium citrate and myo-inositol*)

SOV - Superovulação

TN - Transferência nuclear

TNCS - Transferência nuclear de célula somática

VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade (*Very-low density lipoprotein*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DA FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i>	18
2.2 PROBLEMAS DECORRENTES DA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	21
2.3 METABOLISMO ENERGÉTICO GESTACIONAL EM BOVINOS.....	28
2.3.1 Caracterização de substratos energéticos.....	28
2.3.2 Transporte de substratos energéticos durante a gestação.....	31
2.3.3 Substratos energéticos em gestações derivadas de fecundação <i>in vitro</i>	32
2.4 IMPACTOS DA HIPERFRUTOSEMIA NEONATAL EM BOVINOS.....	35
3 CHAPTER ONE.....	39
3.1 INTRODUCTION.....	39
3.2 MATERIALS AND METHODS.....	41
3.2.1 Animal facilities and experimental animals.....	41
3.2.2 Bovine embryo production.....	41
3.2.2.1 <i>In vitro</i> embryo production.....	41
3.2.2.2 <i>In vivo</i> embryo production.....	42
3.2.3 Embryo transfer, and pregnancy and gender diagnoses.....	43
3.2.4 Parturition and delivery protocol.....	43
3.2.5 Clinical care, evaluation of activity level, and measurements of physical traits in newborn calves	44
3.2.6 Collection of blood, tissue, fetal membranes and urine samples	44
3.2.7 D-Fructose, D-glucose and L-lactate measurements and lipid metabolic profile in sampled fluids	46
3.2.8 Physiological and biochemical analyses in the blood of newborn calves.....	47
3.2.9 Gene expression analysis of key enzymes in the fructose (fructokinase, aldolase B, triokinase) and glycolytic pathways (GAPDH, LDH-A and LDH-B).....	48
3.2.9.1 RNA extraction.....	48
3.2.9.2 cDNA synthesis and qPCR.....	49
3.2.10 Data analyses.....	50
3.3 RESULTS.....	51

3.3.1 Neonatal physical, behavioral, clinical and biochemical characteristics upon birth.....	51
3.3.1.1 Physical and behavioral characteristics of neonates upon birth.....	51
3.3.1.2 Concentrations of substrates in term fetal fluids collected at parturition, in neonatal plasma upon birth, and in urine from first micturition after birth.....	53
3.3.1.3 Analysis of gene expression for key liver enzymes for fructose metabolism in newborn calves upon birth.....	53
3.3.1.4 Clinical signs in newborn calves upon birth.....	55
3.3.1.5 Blood chemistry analyses in newborn calves upon birth.....	57
3.3.1.5.1 Blood gases, acid-base balance and electrolyte concentrations in newborn calves upon birth.....	57
3.3.1.5.2 Liver, muscle and kidney functions in newborn calves upon birth.....	57
3.3.1.5.3 Hematologic parameters in newborn calves upon birth.....	58
3.3.1.5.4 Lipid metabolism in newborn calves upon birth.....	59
3.3.2 Neonatal physical, behavioral, clinical and biochemical characteristics in response to the adaptation to life <i>ex utero</i> from birth to 24 h after birth.....	59
3.3.2.1 Plasma concentrations of D-glucose, D-fructose and L-lactate in newborn calves from birth to 24 h of life.....	59
3.3.2.2 Vital signs in newborn calves from birth to 24 h of life.....	62
3.3.2.3 Blood chemistry analyses in newborn calves from birth to 24 h of life.....	64
3.3.2.3.1 Blood gases, acid base balance and electrolyte concentrations in newborn calves from birth to 24 h of life.....	64
3.3.2.3.2 Hepatic, muscle and kidneys functions in newborn calves from birth to 24 h of life.....	68
3.3.2.3.3 Hematologic parameters in newborn calves from birth to 24 h of life.....	71
3.3.2.3.4 Lipid metabolism in newborn calves from birth to 24 h of life.....	75
3.4 Discussion.....	77
4 CONCLUSÕES.....	84
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões, tanto pelas técnicas de fecundação *in vitro* (FIV) como pela clonagem por transferência nuclear (TN), é uma valiosa ferramenta tanto para a reprodução de animais de produção quanto para estudos na área da biologia do desenvolvimento. Do ponto de vista zootécnico, através da PIV e da transferência de embriões, pode-se multiplicar o número de progênies de animais de interesse, aumentar a vida fértil de animais considerados de alto mérito genético e maximizar a eficiência da utilização de sêmen de touros valiosos. Além disso, sob o ponto de vista científico, esta tecnologia pode ser utilizada para estudar tanto os fatores que envolvem a fecundação e o desenvolvimento de embriões em estádios de pré-implantação, quanto o impacto de sistemas de produção *in vitro* de embriões no desenvolvimento pré- e pós-natal subsequente.

Apesar de a PIV estar bem estabelecida como uma biotécnica da reprodução de ampla utilização em bovinos na atualidade, diversos problemas ainda estão associados a esta tecnologia. Menores taxas de prenhez e maiores taxas de mortalidade embrionária, aborto, distocia e mortalidade peri- e neonatal são problemas que contribuem para diminuir a eficiência e aumentar os custos desta biotécnica quando aplicada à produção animal (BEHBOODI et al., 1995; HASLER et al., 1995; MASSIP et al., 1996; BERTOLINI et al., 2002a, BERTOLINI et al., 2007). Desvios da normalidade observados em bezerros produzidos a partir da manipulação de embriões *in vitro*, tais como o aumento de peso ao nascer, aumentadas incidências de anormalidades congênitas, fraqueza pós-parto, aumentada suscetibilidade a infecções e hipóxia perinatal reduzem a sobrevivência neonatal e sugerem uma alteração no metabolismo energético no período hebdomadal (FARIN e FARIN, 1995; GARRY et al., 1996; SCHMIDT et al., 1996; KRUIP e DEN DAAS, 1997; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000). Além disso, é interessante notar que animais produzidos a partir de sistemas de PIV, como a fecundação *in vitro* e a transferência nuclear de células somáticas (TNCS), com frequência podem apresentar aumentadas concentrações plasmáticas de frutose logo após o parto, o que parece estar associado ao peso ao nascer, e à morbidade e mortalidade pós-parto decorrentes de anormalidades morfológicas e funcionais pré-natais possivelmente de origem placentária (BERTOLINI et al., 2004; BATCHELDER et al., 2007).

Níveis elevados de frutose no período pós-parto imediato podem ter uma influência positiva ou negativa na sobrevivência de neonatos bovinos. A frutose em níveis

normais pode ser favorável em situações de normóxia, potencialmente contribuindo para a homeostasia da glicemia. Como a via metabólica da frutose normalmente contribui para a produção de glicose e lactato por meio da rota via enzima frutoquinase, contornando importantes etapas regulatórias da via glicolítica (MAYES, 1993, BENDER, 2009a, DIGGLE et al. 2009), é provável que altos níveis plasmáticos de frutose possam ser metabolicamente e clinicamente benéficos para adaptação à vida fora do útero, contribuindo para um aumento na glicemia de neonatos bovinos. Uma correlação negativa observada entre as concentrações de frutose e glicose no plasma de neonatos bovinos sugere que o uso de frutose pode ter participação no aumento da glicemia nas primeiras horas de vida (BERTOLINI et al., 2004). Por outro lado, é sugerido que, em casos de desvios de normalidade fisiológica, como em hipóxia sistêmica causada por distúrbio neonatal respiratório, a hiperfrutosemia neonatal possa trazer conseqüências metabólicas negativas profundas, como a acidose láctica, e que podem comprometer a sobrevivência pós-natal (BERTOLINI et al., 2004). Interessantemente, Bertolini et al. (2004) demonstraram que concentrações plasmáticas de frutose e lactato se equiparam no pós-parto e, por associação, ambas parecem ter afetado o balanço ácido-base e a taxa respiratória de neonatos bovinos, algo mais evidente em bezerros oriundos da produção *in vitro* de embriões. De fato, esta possibilidade parece ser especialmente importante para bezerros de PIV, visto que estes animais, por apresentarem mais freqüentemente alguns desvios de desenvolvimento pré-natal, parecem ter uma alta suscetibilidade ao estresse, como a hipóxia peri- e pós-parto (SCHMIDT et al., 1996). Tais observações sugerem que a via metabólica da frutose está ativa no período neonatal de bovinos, e pode contribuir positiva ou negativamente à sobrevivência no período neonatal hebdomadal imediato.

Apesar dos indícios de que a rota metabólica hepática da frutose esteja ativa em bezerros bovinos, estudos demonstrando esta atividade e seus efeitos no período pós-parto de bovinos ainda não foram relatados. Sabe-se então que bezerros oriundos de embriões produzidos *in vitro* pela FIV ou TNCS frequentemente possuem uma maior concentração de frutose plasmática de origem pré-natal, o que em certas condições, como a hipóxia pós-natal, está associada a manifestações clínicas pós-natais que afetam o metabolismo e o equilíbrio ácido-base em maior intensidade do que bezerros controle. Portanto, como a via de metabolização da frutose não apresenta controle homeostático (alostérico ou endócrino) como a via glicolítica, propõe-se a hipótese de que a rota enzimática do metabolismo hepático da frutose esteja ativa e funcional em neonatos bovinos, podendo desempenhar importante contribuição na homeostasia metabólica pós-natal, sendo favorável quando em

normóxia, contribuindo para a gliconeogênese e para o metabolismo oxidativo via Ciclo de Krebs, ou desfavorável quando em situações de hipóxia, contribuindo para a produção de lactato e para um quadro de acidose láctica e desequilíbrio ácido-base nas primeiras 24 a 72 h de vida. Para testar esta hipótese, visamos verificar o papel da frutose no metabolismo energético e no balanço ácido-base no período imediatamente pós-parto em bovinos, avaliando a inter-relação entre parâmetros metabólicos, físicos e clínicos de neonatos bovinos derivados de produção *in vitro* e *in vivo* de embriões, e buscando e esclarecer se e como a frutose plasmática pode afetar a sobrevivência pós-natal de neonatos bovinos derivados de produção *in vitro* e *in vivo* de embriões. Para tanto, os objetivos deste estudo foram (a) comparar as concentrações sanguíneas de frutose, glicose e lactato nas primeiras 24 h de vida de neonatos bovinos oriundos de produção *in vivo* e *in vitro* de embriões; (b) quantificar os transcritos (RNA mensageiro) hepáticos para as enzimas da rota metabólica da frutose (frutoquinase, aldolase B e trioquinase) e da rota glicolítica (GAPDH, lactato desidrogenase A e lactato desidrogenase B); e (c) avaliar a relação entre o equilíbrio ácido-base no sangue de neonatos bovinos com as taxas de frutose, glicose e lactato quando em condições de hipóxia por estresse respiratório pós-parto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DA FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

A fecundação *in vitro* é uma biotecnologia da reprodução amplamente utilizada nos dias atuais. Sua importância abrange tanto aspectos de contribuição científica quanto práticos, destacando-se a sua utilização na reprodução de animais de produção e em clínicas de reprodução humana. É importante ressaltar que, para se atingir o nível de utilização atual desta biotecnologia, muitas descobertas foram realizadas desde o sucesso da fecundação *in vitro* em anfíbios realizada por Lazzaro Spallanzani, no final do século XVIII, até as primeiras tentativas de fecundação *in vitro* de oócitos mamíferos realizadas a partir do século XIX.

Entre 1878 e 1953, numerosas tentativas de fecundar oócitos mamíferos *in vitro* foram realizadas. Entretanto, tais estudos falharam em demonstrar que a subsequente clivagem embrionária era mais devido à penetração de espermatozóides do que pela ativação oocitária por outras causas. Durante a década de 1930, Gregory Pincus e colegas, após extensivos e valiosos estudos, chegaram a registrar o nascimento de lãparos após a transferência de oócitos expostos ao sêmen em ovidutos de coelhos onde a ovulação havia sido induzida. Tais resultados, entretanto, não foram aceitos como convincentes, pois os procedimentos experimentais nem sempre excluía outras possibilidades de fecundação (BAVISTER, 2002; GORDON, 2003).

O passo crucial para o sucesso da FIV foi o reconhecimento do fenômeno da capacitação espermática no início da década de 1950, descrito independentemente por Austin na Austrália e por Chang nos Estados Unidos da América em 1951 (BAVISTER, 2002; BETTERIDGE, 2003; GORDON, 2003). Utilizando ratos e coelhos (AUSTIN, 1951), ou apenas coelhos (CHANG, 1951), ambos os pesquisadores postularam que os espermatozóides deveriam permanecer algum período de tempo dentro do trato reprodutivo feminino, mais precisamente dentro da tuba uterina, para adquirirem a capacidade fecundante, que lhes permitiria penetrar os oócitos maduros.

A partir da contribuição do reconhecimento da capacitação espermática, houve uma retomada de interesse em trabalhos envolvendo a fecundação de oócitos mamíferos *in vitro*, e o nascimento de animais oriundos desta biotecnologia parecia ter se tornado apenas uma questão de tempo. Isto de fato ocorreu em 1959, quando Chang reportou o nascimento de lãparos considerados saudáveis após a transferência de zigotos de coelhos obtidos a partir de oócitos maduros fecundados *in vitro* com sêmen recuperado do útero de coelhas

12 h após a cópula (CHANG, 1959). Este foi o primeiro trabalho a disponibilizar uma técnica repetível de FIV em mamíferos (GORDON, 2003).

Consequentes às descobertas da década anterior, as décadas de 1960 e 1970 compreenderam um período de grande prolificidade no âmbito da tecnologia da FIV. Durante este período, além do êxito de Chang em coelhos, diversos trabalhos relataram a fecundação *in vitro* de oócitos de variadas espécies de mamíferos, tais como *hamsters*, camundongos, ratos, bovinos, felinos, caninos e humanos, entre outras (BAVISTER, 2002).

Em bovinos, a primeira fecundação *in vitro* de oócitos bovinos foi realizada com sucesso no Japão por Iritani e Niwa em 1977 (BETTERIDGE, 2003; GORDON, 2003). Estes pesquisadores utilizaram oócitos maturados *in vitro* obtidos através de aspiração folicular de ovários de abatedouro e sêmen capacitado de três formas distintas: incubado em solução salina em atmosfera controlada a 37°C por 12-14 h; incubado em solução salina em trato genital isolado de vaca em estro mantido a 37°C por 3-4 h; e incubado *in vivo* em trato genital de coelha por 12-14 h. A observação de penetração espermática, o aparecimento dos pro-núcleos feminino e masculino, e o aparecimento do segundo corpúsculo polar foram parâmetros utilizados para a confirmação de fecundação dos oócitos, com apenas o grupo de oócitos inseminados com sêmen capacitado em sistema essencialmente *in vitro* não apresentando nenhuma confirmação de fecundação (IRITANI e NIWA, 1977). Entretanto, apesar do progresso alcançado na fecundação *in vitro* de oócitos bovinos, o sucesso desta biotecnologia continuava limitado, não sendo aplicável a animais de produção, com apenas trabalhos envolvendo coelhos, camundongos, ratos e humanos resultando em nascimentos a partir da FIV nas décadas de 1960 e 1970 (BRACKET et al., 1982).

O nascimento de Louise Brown, o primeiro bebê oriundo de FIV, no final da década de 1970, foi um marco de grande impacto para a reprodução humana e para a ciência da reprodução. O bebê foi considerado saudável e o seu nascimento abriu novas possibilidades para mulheres com histórico de infertilidade (STEPTOE e EDWARDS, 1978). Conforme revisado por Betteridge (2003), este feito chamou a atenção do público para a técnica da fecundação *in vitro* como nunca antes havia ocorrido, dando novo ímpeto à produção de diversos trabalhos posteriores em humanos e em diversas espécies animais.

A década de 1980 foi um período de grandes realizações no âmbito da fecundação *in vitro* de oócitos de animais de produção. O primeiro bezerro oriundo de FIV, chamado de Virgil, nasceu em 09 de junho de 1981 e foi descrito como sendo completamente

normal (BRACKETT et al., 1982). Virgil foi fruto do esforço de Brackett e colaboradores em desenvolver procedimentos práticos para a reprodução de bovinos e, ao mesmo tempo, fornecer um modelo útil para acelerar o avanço da compreensão da fecundação e desenvolvimento no homem e em outros mamíferos, o que ainda denota certa influência da importância dos trabalhos de FIV em humanos. Os procedimentos descreveram a utilização de sêmen bovino capacitado *in vitro* para a inseminação de oócitos maturados *in vivo* recuperados de ovidutos e de folículos ovarianos de fêmeas bovinas através de cirurgia ao redor do período de ovulação. Após a FIV e um breve cultivo *in vitro*, os pesquisadores obtiveram sucesso transferindo embriões no estágio de 8-células para o oviduto de fêmeas receptoras com ciclo estral sincronizado. As perspectivas da utilização da FIV sugeridas por Brackett e seus colegas após o nascimento de Virgil eram de grande otimismo para a época. Uma nova dimensão para a reprodução animal além da inseminação artificial foi sugerida, e a extensão da vida fértil de valiosos animais de produção foi citada como uma aplicação desta técnica. No entanto, devido à complexa logística do protocolo descrito naquele trabalho, como a necessidade de maturação *in vivo* de oócitos e transferência cirúrgica para os ovidutos, tal biotecnologia ainda não estava pronta para ser utilizada da maneira sugerida pelos autores naquela época (BETTERIDGE, 2003).

Diversos trabalhos subsequentes contribuíram tremendamente para o progresso da FIV em bovinos nos anos que se seguiram ao nascimento de Virgil. Por exemplo, a eficácia de fecundação *in vitro* de oócitos bovinos aumentou quando estes foram mantidos a 39°C (LENZ et al., 1983); a eficiência da maturação *in vitro* de oócitos foi elevada através de procedimentos simples como a adição de células do *cumulus* ao meio de cultivo (MOOR et al., 1984); um aumento das taxas de fecundação *in vitro* de oócitos bovinos foi observado quando sêmen bovino foi capacitado *in vitro* na presença de heparina (PARRISH et al., 1985). Além dos avanços diretamente relacionados aos métodos laboratoriais de PIV de embriões bovinos, a laparoscopia surgiu como uma alternativa aos procedimentos cirúrgicos realizados para a obtenção de oócitos bovinos na época (SIRARD e LAMBERT, 1985), sendo rapidamente substituída pela técnica menos invasiva da aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal, ou *ovum pickup* (OPU), proposta por PIETERSE et al. (1988). Por fim, ainda antes do final da década de 1980, Gandolfi e Moor (1987) e Rexroad e Powell (1988) desenvolveram em ovinos um sistema de co-cultivo embrionário com células somáticas que permitiram o suporte ao desenvolvimento embrionário em cultivo completamente *in vitro*. Em bovinos, isto permitiu o nascimento dos primeiros bezerros derivados de embriões produzidos em

sistema essencialmente *in vitro*, desde a maturação de oócitos, passando pela fecundação e pelo cultivo embrionário *in vitro* (LU et al., 1988 *apud* GORDON, 2003), o que ampliou tremendamente as perspectivas para a utilização da PIV em produção animal, levando a uma explosão de utilização e aplicação desta biotecnologia nas duas décadas subsequentes.

Avanços alcançados nos sistemas de produção *in vitro* de embriões a partir da década de 1980 impulsionaram a utilização desta tecnologia como uma importante ferramenta na reprodução de bovinos (BETTERIDGE, 2003). Atualmente, o número de transferências de embriões bovinos produzidos *in vitro* vem crescendo ao redor do planeta, com destaque para o Brasil, que é atualmente o maior produtor mundial de embriões oriundos de FIV (STROUD, 2011).

A ampla utilização da FIV nos dias atuais demonstra o quanto o uso desta biotecnologia se tornou valioso na reprodução animal ao longo dos anos, além de seu destaque como uma importante ferramenta para auxiliar a compreensão de fatores que envolvem os eventos biológicos da fecundação e do desenvolvimento embrionário em estádios de pré-implantação. Entretanto, desde o final dos anos 80 e início dos anos 90, quando laboratórios no mundo passaram a fazer uso de sistemas de produção *in vitro* de embriões bovinos para fins científicos, preservacionistas e principalmente comerciais, seja em pequena ou em larga escala, diversas anormalidades pré- e pós-natais de caráter imprevisível e que estão associadas a uma diminuição da eficiência e a um aumento dos custos de aplicação desta biotecnologia foram e vêm sendo sistematicamente relatadas no curso do desenvolvimento do conceito, suscitando diversas investigações sobre possíveis fatores que afetam o desenvolvimento embrionário, feto-placentário, e a saúde e sobrevivência de animais oriundos de manipulação embrionária *in vitro* (BEHBOODI et al., 1995; HASLER et al., 1995; MASSIP et al., 1996; FARIN et al., 2001; BERTOLINI e ANDERSON, 2002; BERTOLINI et al., 2002a; BERTOLINI et al., 2002b; CROSIER et al., 2001; BERTOLINI et al., 2004; FARIN et al., 2006).

2.2 PROBLEMAS DECORRENTES DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Vários problemas associados aos sistemas de produção *in vitro* vêm sendo observados desde que embriões bovinos passaram a ser produzidos de forma ampla ao redor do mundo e mesmo em larga escala. Tais problemas reduzem a eficiência e ainda limitam a utilização de técnicas da reprodução como a PIV de embriões, tanto pela FIV quanto pela clonagem por TNCS, apesar da maior utilização da FIV na atualidade.

Buscando uma maior compreensão dos fatores que envolvem a biologia do desenvolvimento e um aumento na eficiência final destas tecnologias da reprodução animal, diversos estudos científicos vêm investigando nas últimas duas décadas as possíveis causas das anormalidades observadas em conceptos e animais oriundos de sistemas de produção *in vitro* de embriões, em especial na espécie bovina.

Os sistemas de PIV de embriões mamíferos que convergem as etapas de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos, fecundação *in vitro* (FIV) ou clonagem por TNCS, e cultivo *in vitro* (CIV) de embriões, estão no cerne dos problemas de desenvolvimento e metabolismo observados em conceptos oriundos de manipulação embrionária *in vitro*. Sabe-se que o uso de meios de cultivo celular de formulações complexas como meio-base para o cultivo *in vitro* de embriões, aliado à adição de soro como fonte protéica e ao uso de co-cultivo embrionário em presença de células somáticas, estão intimamente associados a modulações no desenvolvimento embrionário *in vitro* nos primeiros dias de vida e que se traduzem em alterações no desenvolvimento pré- e/ou pós-natal subsequentes (BERTOLINI e ANDERSON, 2002; BERTOLINI et al., 2002; BERTOLINI et al., 2007). Em busca de protocolos práticos e eficientes, diversas condições de CIV de embriões vêm sendo modificadas, com ampla variação entre laboratórios, incluindo diferenças entre meios de cultivo, fontes de proteína, adição de hormônios e fatores de crescimento, presença ou ausência de células somáticas, temperatura, densidade embrionária, uso ou não de cobertura do meio com óleo mineral, atmosfera gasosa, superfície de troca gasosa, entre outras (THOMPSON et al., 2007). A considerável eficiência atingida na produção de mórulas e blastocistos bovinos frente a diversas condições de cultivo demonstra enorme adaptabilidade de embriões ao ambiente *in vitro*. Entretanto, esta capacidade de adaptação a diferentes condições não passa incólume e pode levar a alterações significativas no metabolismo, na expressão gênica e no desenvolvimento subsequente destes embriões, indicando que as tentativas de mimetizar as condições de desenvolvimento de embriões *in vivo* ainda são sub-ótimas e estão distantes do ideal (NIEMANN e WRENZYCKI, 2000; WRENZYCKI et al., 2004; FARIN et al., 2006; THOMPSON et al., 2007).

Conforme mencionado acima, dentre os diversos fatores que afetam os sistemas de PIV, destacam-se o uso do co-cultivo de embriões com células somáticas e do soro como fonte protéica para o desenvolvimento, em meio-base complexo que se destina prioritariamente ao cultivo celular. Paradoxalmente, foi exatamente a presença de células de suporte e de soro no CIV de embriões de animais de produção (GANDOLFI e MOOR, 1987), ou de meio condicionado por células somáticas (EYESTONE e FIRST, 1989), que

permitiram o sucesso no desenvolvimento *in vitro* de embriões até o estágio de blastocisto. Diversos trabalhos se valeram das ações benéficas ou deletérias destes componentes para produzir e transferir blastocistos para fêmeas receptoras (BEHBOODI et al., 1995; HASLER et al., 1995; MASSIP et al., 1996) ou para estudar as causas e consequências subsequentes às anormalidades da manipulação embrionária *in vitro* (FARIN e FARIN, 1995; HOLM et al., 1996; BERTOLINI et al. 2002ab, 2004, 2006). Várias são as ações das células somáticas como suporte ao desenvolvimento embrionário no CIV, destacando-se os condicionamentos positivo e/ou negativo do meio, pela liberação de fatores de crescimento importantes ao desenvolvimento embrionário, modificação de características bioquímicas e dos níveis de substratos no meio, e pela remoção de substâncias que possam comprometer o desenvolvimento embrionário (BAVISTER, 1992; BAVISTER et al., 1992). O soro, por sua vez, além de conter fatores de crescimento e hormônios, é requerido para o cultivo de células somáticas de suporte *in vitro*, sendo uma importante fonte de nitrogênio para o metabolismo de embriões na fase de pré-implantação (GARDNER et al., 1994; THOMPSON, 2000; VANROOSE et al., 2001). Entretanto, apesar de contribuírem para o desenvolvimento embrionário *in vitro*, estes elementos tornam os meios de CIV indefinidos e frequentemente seu uso traz impactantes efeitos adversos aos embriões em seu desenvolvimento subsequente.

Diversos trabalhos que fizeram uso de soro e células somáticas no CIV de embriões relataram uma vasta gama de problemas subsequentes, destacando-se a alta frequência em bovinos de nascimento de bezerros com peso elevado derivados de FIV (BEHBOODI et al., 1995; HASLER et al., 1995; MASSIP et al., 1996; JACOBSEN et al., 2000; BERTOLINI et al., 2002a, 2004) ou de TNCS (BATCHELDER et al., 2007). Tal característica nestes estudos está geralmente associada a aumentadas incidências de distocia e cesariana, aborto, gestações mais longas, mortalidade peri- e neonatal, reduzido número de placentônios, hidropsia das membranas fetais e anormalidades congênitas (BEHBOODI et al., 1995; FARIN e FARIN, 1995; HASLER et al., 1995; MASSIP et al., 1996; SCHMIDT et al., 1996; KRUIP e DEN DAAS, 1997; JACOBSEN et al., 2000; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000). Este conjunto de problemas é comumente referido como “Síndrome do Bezerro Absolutamente Grande” (em obstetria veterinária, o termo “absolutamente grande” indica um feto maior do que o normal, para um canal do parto de dimensões e condições fisiológicas adequadas), ou, do inglês, “Large Offspring Syndrome” (LOS). Devido ao termo LOS abranger diversas anormalidades que

não apenas bezerros de peso aumentado, outros termos, tais como “Síndrome do Bezerro Anormal” (FARIN et al., 2006), também têm sido propostos.

Alterações na morfologia, no desenvolvimento e no metabolismo de embriões co-cultivados *in vitro* com células somáticas na presença de soro parecem estar associados aos problemas observados na LOS. De fato, blastocistos produzidos neste tipo indefinido de sistema apresentaram alterações no desenvolvimento e na qualidade das células da massa celular interna (IWASAKI et al., 1990; VAN SOOM et al., 1996). Além disso, quando embriões bovinos co-cultivados *in vitro* com células somáticas na presença de soro foram comparados com embriões cultivados *in vitro* sem a presença destes fatores ou com embriões produzidos *in vivo*, foi observado um desenvolvimento embrionário peri-compactação acelerado, e mórulas com maiores inclusões lipídicas e menor compactação, o que posteriormente resultou em maior ocorrência de aborto, hidroalantóide e anormalidades congênitas (especialmente de membros), não havendo diferença destas características entre o grupo cultivado *in vitro* em meio definido e o grupo de embriões produzido *in vivo* (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000). Em adição, Dorland et al. (1994) e Shamsuddin e Rodriguez-Martinez (1994) observaram o acúmulo de gotas lipídicas osmiofílicas no citoplasma de embriões ovinos e bovinos cultivados na presença de soro, com a descrição de uma leve incidência de degeneração mitocondrial, vacuolização citoplásmica e outras aberrações subcelulares. Desta forma, o acúmulo de lipídios observado em embriões produzidos *in vitro* parece ser resultado de um metabolismo mitocondrial inadequado ou insuficiente, e parece afetar negativamente o desenvolvimento embrionário subsequente (CROSIER et al., 2001).

Efeitos da presença de soro no desenvolvimento embrionário também têm sido relatados em meios de CIV sem a presença de células. Em um trabalho comparando a suplementação com diferentes tipos de soro (soro fetal bovino ou soro de neonatos bovinos) em meio de cultivo TCM-199, Pinyopummintr e Bavister (1994) reportaram uma eficiência superior do soro fetal bovino do desenvolvimento de blastocistos. Entretanto, neste mesmo trabalho, os autores verificaram que a o uso de suplementação de soro em meio de CIV resulta em um efeito bifásico no desenvolvimento embrionário, onde a primeira clivagem é inibida, mas o desenvolvimento de blastocistos é estimulado.

Indo ao encontro com as alterações de metabolismo e de desenvolvimento embrionário, um padrão alterado de crescimento pós-implantação foi observado por Bertolini et al. (2002a) por meio de ultrassonografia em gestações de conceitos produzidos por FIV e cultivados *in vitro* em presença de 10% de soro fetal bovino e de células

epiteliais de oviduto bovinos, comparando-os a prenhez controlada de embriões produzidos *in vivo*. Os autores observaram um atraso inicial no crescimento dos conceitos de FIV em relação a conceitos produzidos *in vivo* entre os dias 37 e 58 de gestação; em seguida, observou-se semelhança de medidas entre os dois grupos de conceitos (65 a 72 dias de gestação); por fim, neonatos derivados de FIV foram maiores ao nascimento, indicando uma aceleração de desenvolvimento no final da gestação. Alterações significativas de morfologia e de desenvolvimento de placentônios também ocorreram no grupo de conceitos produzidos *in vitro* em comparação ao grupo de embriões produzido *in vivo* (BERTOLINI et al., 2002a). A observação destes padrões alterados de desenvolvimento refletiu alterações morfológicas de conceitos de 16 dias produzidos e cultivados *in vitro* a partir do mesmo sistema, onde foram detectados um menor diâmetro do disco embrionário e um menor comprimento do trofoblasto em embriões de FIV em relação a embriões produzidos *in vivo* (BERTOLINI et al., 2002b). Tais diferenças detectadas em conceitos de 16 dias são interessantes, pois esta fase antecede imediatamente o reconhecimento materno da gestação, o início de placentação e a formação das membranas extra-embrionárias.

Em adição aos dados de trabalhos com animais de produção, também se demonstrou que o uso de soro no CIV de embriões murinos prejudicou a taxa de desenvolvimento ao estágio de blastocisto, reduziu a expressão de genes de caráter de *imprinting* relacionados ao crescimento, e aumentou o padrão de metilação de DNA de genes de *imprinting* relacionados ao crescimento fetal, o que é indicativo de alterações epigenéticas (KHOSLA et al., 2001; FERNÁNDEZ-GONZALEZ et al., 2004). Além disso, o uso do soro no CIV de embriões tem efeitos epigenéticos em longo prazo em camundongos, tais como elevados níveis de ansiedade e hiperatividade e menores níveis de memória implícita (FERNÁNDEZ-GONZALEZ et al., 2004).

Cabe ressaltar que as anormalidades de desenvolvimento de embriões não estão restritas apenas pela presença de soro e/ou células no cultivo embrionário *in vitro*. Em um estudo em bovinos por Crosier et al. (2001), compararam-se sistemas de produção *in vitro* de embriões bovinos pela MIV com presença de soro de vaca em estro, FIV com outra suplementação protéica (BSA, ou albumina sérica bovina), e com três diferentes condições de CIV, sem células somáticas de suporte: soro de vaca em estro, restrição de soro ou ausência de soro. Os resultados de produção de embriões foram comparados entre si e com um grupo de embriões produzido e cultivado *in vivo*. Curiosamente, o grupo de blastocistos cultivado *in vitro* em ausência de soro apresentou alterações de morfologia,

tais como o aumento de densidade de volume de lipídios e de densidade de volume de vacúolos citoplasmáticos de forma mais evidente do que todos os grupos testados (CROSIER et al., 2001), o que demonstrou que outros fatores *in vitro* também estão associados ao aparecimento de anormalidades. Em outro trabalho, comparando-se as etapas de MIV e FIV em meio com ou sem soro bovino, e de CIV com soro bovino ou álcool polivinílico (PVA), foi observado que o uso do soro em todas as etapas de produção *in vitro* acelerou o desenvolvimento de embriões bovinos até o estágio de blastocisto expandido em relação a embriões que resultaram do uso de soro somente na maturação e fecundação *in vitro* ou somente no cultivo *in vitro* (HOLM et al., 2002). Ainda em outro estudo, quando soro de vaca em estro foi utilizado na etapa de MIV de oócitos bovinos, e a utilização de soro ou albumina sérica bovina foi testada nas etapas de FIV e CIV de embriões bovinos, anormalidades de desenvolvimento placentário foram observadas em maior grau no grupo que utilizou outra fonte protéica que não o soro nas etapas de fecundação e cultivo *in vitro* de embriões bovinos (MILES et al., 2005).

Com o objetivo de definir o sistema de PIV de embriões para aprimorar o estudo da fisiologia embrionária e reduzir problemas de desenvolvimento embrionário e fetal, meios quimicamente definidos ou semi-definidos têm sido propostos na tentativa de reduzir a utilização de células somáticas de suporte e de soro na PIV de embriões (GARDNER et al., 1994; FARIN et al., 2001; VANROOSE et al., 2001). Uma fonte alternativa de proteína é a albumina sérica bovina, mas esta também varia consideravelmente em sua pureza (GARDNER et al., 1994). Sistemas de PIV totalmente definidos têm sido desenvolvidos com a substituição de albumina sérica por álcool polivinílico (KESKINTEPE e BRACKET, 1996). Entretanto, sistemas quimicamente definidos, tais como a reposição de soro ou albumina por PVA, geralmente resultam em menores níveis de desenvolvimento e de viabilidade dos embriões (THOMPSON, 2000). Desta forma, mesmo que a formulação de meios de cultivo *in vitro* de embriões mais definidos, mais simples e mais adequados à fisiologia embrionária tenha sido proposta, a suplementação de soro, em menores proporções e em conjunto à BSA, e a inclusão de uma densidade menor de células somáticas de suporte no cultivo *in vitro* de embriões continuam sendo muito empregados em sistemas de PIV de embriões por FIV em animais de produção por muitos grupos ao redor do mundo. Como consequência, os imprevisíveis fenótipos anormais decorrentes da manipulação embrionária *in vitro* ainda persistem, apesar de ocorrerem em uma (perigosa) menor escala.

É fato que as diversas alterações detectadas em embriões, fetos, placentas e neonatos são inerentes aos diversos processos de PIV e ainda limitam a eficiência desta biotécnica. Dentre os diversos fatores que contribuem para desenvolvimento anormal de conceitos, taxas reduzidas de gestação, aumentado peso ao nascer de bovinos oriundos de FIV e TNCS, e alterações placentárias possuem papel de destaque (BERTOLINI e ANDERSON, 2002; FARIN et al., 2006). Anormalidades encontradas em placentas de gestações oriundas de técnicas de produção de embriões *in vitro* no terço final da gestação incluem a hidropsia das membranas fetais, especialmente hidroalantóide (HASLER et al., 1995; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000; CONSTANT et al., 2006), placentônios com maior diâmetro e menor espessura (BERTOLINI et al., 2002a; BERTOLINI et al., 2004) e em número reduzido com base no peso corporal (FARIN e FARIN, 1995). Além disso, foi evidenciada uma maior quantidade de células picnóticas fetais, o que é indicativo de morte celular em placentônios, maior área de superfície de placentônios e menor área de contato feto-maternal durante gestação de bovinos, sendo indicativos de menor eficiência placentária que parecem estimular mecanismos compensatórios, como uma maior vascularização por área de superfície de placentônios (MILES et al., 2004; MILES et al., 2005; BATCHELDER et al., 2007).

Distúrbios de regulação energética feto-placentária também parecem estar intimamente associados a problemas neonatais em bezerros oriundos de produção embrionária *in vitro* (GARRY et al., 1996; BERTOLINI et al., 2004). Como todos os substratos exigidos para crescimento e desenvolvimento feto-placentário são originários do sistema materno, e como as quantidades de substratos que atingem o feto são transportadas, metabolizadas e modificadas pela placenta (BERTOLINI et al., 2004), é lógico inferir que os distúrbios na placentação possam estar associados a anormalidades fetais e podem resultar em limitadas disponibilidade nutricional e trocas gasosas no final da gestação (BERTOLINI et al., 2002a; FARIN e FARIN, 1995). Problemas sugestivos de metabolismo energético alterado, tais como fraqueza pós-parto, hipotermia, hipoxemia, hipoglicemia e acidose metabólica, somados a um elevado peso ao nascer, a problemas congênitos e a uma aumentada susceptibilidade a infecções, são normalmente indicativos de dificuldade de ajuste à vida extra-uterina no período pós-parto imediato em neonatos bovinos oriundos de embriões produzidos *in vitro* (GARRY et al., 1996; SCHMIDT et al., 1996; BERTOLINI et al., 2004; BATCHELDER et al., 2007), com tais fatores contribuindo para a aumentada taxa de mortalidade perinatal em animais derivados de PIV. Conforme Garry e colaboradores (1996), a aumentada susceptibilidade a infecções é um

importante contribuinte para a mortalidade de bezerros na primeira semana de vida. Portanto, especial atenção deve ser dada à identificação de problemas derivados de desordem do metabolismo energético, pois estes nem sempre são evidentes e podem contribuir para reduzir a adaptação metabólica e fisiológica à vida *ex utero* e a resistência a infecções, aumentando desta forma a mortalidade pós-parto nestes animais.

2.3 METABOLISMO ENERGÉTICO GESTACIONAL EM BOVINOS

Além dos problemas no período neonatal hebdomadal imediato, é interessante notar que neonatos bovinos derivados de produção *in vitro* podem apresentar aumentadas concentrações plasmáticas de frutose logo após o parto, o que parece ser fruto de aumentadas concentrações de frutose já no ambiente uterino em decorrência de alterações morfológicas e metabólicas da placenta (BERTOLINI et al., 2004; BATCHELDER et al., 2007), órgão responsável pela frutogênese a partir da glicose durante a gestação (HAY, 1995). Altos níveis plasmáticos de frutose podem ser metabolicamente e clinicamente benéficos para adaptação à vida extrauterina, mas em casos de desvios de normalidade fisiológica, como em hipóxia sistêmica causada por distúrbio neonatal respiratório, a presença de hiperfrutosemia pode trazer consequências metabólicas profundas, como a acidose láctica, que pode comprometer significativamente a sobrevivência pós-natal (BERTOLINI et al., 2004). Este fato parece ser especialmente importante em bezerros derivados de produção *in vitro*, visto que estes animais parecem ter uma alta suscetibilidade ao estresse respiratório e à hipóxia durante e após o parto (SCHMIDT et al., 1996; GARRY et al., 1996). Entretanto, para que os níveis plasmáticos de frutose exerçam influência metabólica no período neonatal imediato em bovinos, vias enzimáticas específicas relacionadas ao metabolismo da frutose devem estar ativas no tecido hepático de neonatos bovinos.

2.3.1 Caracterização de substratos energéticos

A glicose é o substrato mais importante para o metabolismo oxidativo em de conceptos mamíferos, incluindo bovinos e ovinos (REYNOLDS et al., 1990; FERRELL e REYNOLDS, 1992). Entretanto, diferentemente do que outrora se considerava, a descarboxilação direta de glicose contribui apenas para 15-18% do consumo de glicose no sistema útero-placenta para a produção de dióxido de carbono (CO₂), com a oxidação de

glicose contribuindo com apenas de 23% (em baixa glicemia materna) a 34% (em alta glicemia materna) do consumo útero-placentário de oxigênio em ovinos (ALDORETTA e HAY, 1999). Além disso, estudos constataram em ovinos que a oxidação fetal de glicose representa 25 a 45% do consumo fetal de O_2 (TSOULOS et al., 1971; HAY et al., 1989). Portanto, a maior parte do oxigênio consumido pelo sistema útero-placenta e pelo feto ovino parece ser utilizada para oxidar outros carbonos que não são provenientes do relativamente imediato metabolismo de glicose recém captada pelo sistema útero-placentário (HAY et al., 1989; ALDORETTA e HAY, 1999). Para suprir ao menos parte da exigência de oxigenação imposta pela taxa respiratória fetal, a placenta desempenha um importante papel metabolizando glicose em lactato na maioria das espécies, e em frutose, em ungulados e cetáceos (GOODWIN, 1956; NIXON, 1963), e em especial em ruminantes (HAY, 1995). Em ovinos, no terço final da gestação, a oxidação de frutose e de lactato contribuem significativamente para o cálculo da magnitude da oxidação fetal de glicose (MEZNARICH et al., 1987; MCGOWAN et al., 1995). Em adição, aminoácidos e talvez ácidos graxos e cetoácidos sejam os únicos outros substratos que completam o balanço energético do conceito na gestação. Portanto, a placenta não apenas atua para transportar nutrientes para o feto, mas também provê produtos metabólicos que, por sua vez, tornam-se suplementos nutritivos fundamentais para o metabolismo fetal e placentário (HAY, 1995).

Dentre as potenciais fontes de energia e de carbono para o feto mamífero, a frutose se destaca quantitativamente como o principal carboidrato presente na circulação sanguínea fetal de ungulados e cetáceos, superando consideravelmente as concentrações de glicose (GOODWIN, 1956; WALKER, 1959; BATTAGLIA e MESCHIA, 1978; MEZNARICH et al., 1987; PÈRE, 2003). Entretanto, apesar de sua contribuição para o metabolismo energético fetal, seu destino metabólico ainda é parcialmente incerto. A frutose é sintetizada na placenta a partir de glicose e é transferida ao feto pela circulação sanguínea (HUGGETT et al., 1951; WALKER, 1959). Evidências de trocas rápidas de moléculas de frutose sugerem que a placenta não apenas produz, como também é consumidora deste carboidrato. De fato, tanto o metabolismo placentário quanto o metabolismo fetal são as principais vias de eliminação de frutose fetal (MEZNARICH et al., 1987). Em ovelhas bem alimentadas, a frutose fetal é oxidada em taxas muito lentas, apesar de sua alta concentração plasmática. Em contraste, a glicose possui uma concentração sanguínea fetal muito menor, para uma taxa de oxidação cinco vezes maior. Tais características estão parcialmente inter-relacionadas, já que uma baixa metabolização

também determina um acúmulo do substrato no plasma e fluidos fetais, sendo a síntese ou aporte do substrato, em seu final, um dos determinantes adicionais das concentrações de glicose e frutose plasmáticas no sistema fetal. Em ovinos, a frutose, uma vez sintetizada na placenta e liberada na circulação fetal, é prontamente convertida em lactato, tanto pela placenta quanto pelo feto, e não é aparentemente convertida de forma apreciável em glicose (MEZNARICH et al., 1987).

A taxa de produção de frutose pelo sistema útero-placentário é controlada pela concentração de glicose fetal e materna. Uma parte de glicose captada a partir do sistema materno é convertida em frutose pela placenta, sendo a atividade frutogênica dependente da glicemia materna e fetal (ALDORETTA e HAY, 1999). Meznarich e colaboradores (1987) observaram que a produção e oxidação de moléculas de frutose fetal e materna caem durante o jejum de ovelhas gestantes concomitantemente com uma queda nas concentrações de glicose. De fato, a conversão da glicose em frutose mantém o gradiente de concentração química de glicose mais elevado entre os sistemas materno e fetal, favorecendo um aumento na difusão de glicose no sentido materno-fetal. Em adição, McGowan e colegas (1995) demonstraram em ovinos que a produção fetal de CO₂ a partir de frutose é menor em animais hipoglicêmicos e maior em animais hiperglicêmicos em comparação àqueles em normoglicemia durante infusões de glicose universalmente marcada com ¹⁴C. Em concordância, em outro estudo com ovinos, Aldoretta e Hay (1999) demonstraram que a concentração de frutose fetal varia conforme as concentrações maternas de glicose. Portanto, o estado metabólico da mãe e do feto influencia diretamente nas taxas de captação de glicose placentária, e na produção placentária, captação fetal e metabolismo fetal de frutose e lactato.

Embora a captação de frutose via circulação umbilical represente uma fonte de energia de reserva em potencial para o feto, também contribuindo para o aumento do gradiente químico de glicose materno-fetal, a captação de frutose em ovinos representa aproximadamente 14% da captação somada de glicose e lactato (MEZNARICH et al., 1987). Supondo-se que toda a frutose fetal seja derivada da glicose, estima-se que aproximadamente 20% da glicose captada pelo útero gestante seja convertida em frutose fetal (MEZNARICH et al., 1987). Em geral, o fluxo de frutose da placenta para o feto é relativamente pequeno, com a frutose sendo lentamente catabolizada pela placenta e pelo feto, de forma que apenas 4% do CO₂ produzido pelo útero gestante é derivado da oxidação da frutose em curto prazo (MEZNARICH et al., 1987). Porém, a importância da

frutose em curto e longo prazo na fase pré-natal e na vida pós-natal imediata ainda permanecem elusivos em bovinos.

2.3.2. Transporte de substratos energéticos durante a gestação

Os principais substratos energéticos para os conceptos de ruminantes apresentam distintas características de transporte transplacentário. A presença de uma concentração considerável de frutose no sangue fetal e a sua ausência virtual no sangue materno indicam que a placenta deve ser impermeável a este carboidrato no sentido feto-materno (WALKER, 1959; MEZNARICH et al., 1987; PÈRE, 2003). Por outro lado, tanto glicose quanto lactato transitam entre as circulações fetal e materna (WALKER, 1959; FERRELL et al., 1983; HAY, 1995; MCGOWAN et al., 1995).

O transporte de carboidratos através da placenta de mamíferos é mediado por uma complexa família de proteínas isoméricas facilitadoras de transporte (GLUT), sódio-independentes, que são divididas em três sub-grupos (GIRNIENE et al., 2003). O grupo da classe A consiste de transportadores de glicose (GLUT-1 a GLUT4), que preferencialmente transportam glicose. O grupo da classe B inclui o GLUT-5 e diversas isoformas similares. O GLUT-5 é específico para frutose e tem sido assumido (baseado em similaridade de sequência gênica) que o GLUT-7 e o GLUT-9 possuem especificidade similar. O GLUT-8 e o GLUT-10 transportam tanto glicose como frutose e são membros de um terceiro sub-grupo, a classe C, que também inclui o descaracterizado GLUT-12 (GIRNIENE et al., 2003). Além destes transportadores, há o GLUT-13, localizado no cérebro com especificidade para o transporte de mioinositol (MANOLESCU et al., 2007). A presença de proteínas facilitadoras de transporte da isoforma GLUT-1 em ambos os lados do trofoblasto permite um transporte bidirecional de glicose através de toda a placenta (HAY, 1995). Porém, tem sido sugerido que, durante o curso da gestação, o GLUT-1 é importante para a captação da glicose para a utilização pela placenta, enquanto o GLUT-3 parece exercer a função de transferência de glicose ao feto (EHRHARDT and BELL, 1997). A frutose, por sua vez, é transportada em células mamíferas pelo GLUT-5 e supostamente por outros membros da família de transportadores de glicose (GIRNIENE et al., 2003). Em outras palavras, a glicose pode ser transportada no sentido materno-fetal ou feto-materno, dependendo do gradiente químico entre estes dois sistemas. Em termos fisiológicos, o gradiente de concentração plasmático materno-fetal de glicose, ou seja, a diferença entre as concentrações de glicose entre o plasma materno e o plasma fetal, é

fundamental para que haja transferência de glicose da mãe para o feto, pois o sangue materno sempre busca manter a normoglicemia, com captação constante de nutrientes do ambiente, enquanto que o sistema fetal está continuamente consumindo glicose para seu crescimento e metabolismo oxidativo e não-oxidativo.

Para que uma adequada transferência de glicose no sentido materno-fetal seja mantida, mesmo em crescentes concentrações maternas e fetais de glicose, algumas condições metabólicas fetais e placentárias singulares são importantes. Primeiramente, a placenta é um órgão de alta atividade metabólica, com um consumo elevado e dinâmico de glicose, que aumenta conforme aumentam as concentrações maternas e fetais de glicose. Em adição, as proteínas transportadoras de glicose presentes nas membranas fetais placentárias possuem saturação cinética, isto é, um aumento nas concentrações plasmáticas maternas de glicose é acompanhado por um aumento no transporte de glicose para o sistema útero-placentário e o sistema fetal (HAY, 1995). Em casos de aumento no suprimento de glicose e, conseqüentemente, no consumo deste substrato pela placenta, o uso da glicose é redirecionado para vias não-oxidativas, como a síntese da frutose (MEZNARICH et al., 1987; HAY, 1995). Em casos de aumento de consumo placentário de glicose, ocorre um aumento da diferença do gradiente de concentração de glicose (HAY, 1995), o que, por sua vez, acarretará uma maior síntese de frutose pelo tecido placentário, conforme revisado por Bertolini et al. (2004).

2.3.3. Substratos energéticos em gestações derivadas de fecundação *in vitro*

Já foi demonstrado anteriormente que gestações derivadas de FIV não apenas podem sustentar conceptos maiores durante o final do segundo semestre de gestação, como também podem apresentar um aumento significativo nas concentrações de frutose na circulação fetal e nos fluídos amniótico e alantóico do segundo para o terceiro terço da gestação (BERTOLINI et al., 2004). Tais alterações parecem estar associadas a um aumento na captação de glicose por placentas derivadas de FIV e da clonagem por TN, o que poderia promover uma aceleração do crescimento fetal em gestações oriundas de FIV e TN, pela maior disponibilidade deste substrato energético, além de levar a um aumento na síntese e na disposição de frutose no plasma fetal e nos fluídos associados (BERTOLINI et al., 2004; BATCHELDER et al., 2005).

Com base na Lei de Fick, a difusão de uma substância através de uma membrana semi-permeável é diretamente proporcional ao gradiente de concentração (ΔC) entre os

dois compartimentos, à permeabilidade (P) e à superfície ou área da membrana (A), sendo inversamente proporcional à distância (L) que separa os dois compartimentos, ou a espessura da membrana (KAY, 1998). Presume-se que o mesmo se aplique ao modelo da placenta e sua capacidade de transporte de nutrientes durante a gestação (ALDORETTA e HAY, 1999; BERTOLINI et al., 2002a; BERTOLINI et al., 2004; BERTOLINI et al., 2006). Além disso, a partição dos nutrientes no tecido placentário pode modular o crescimento do conceito no curso da gestação. Fisiologicamente, supõe-se que as alterações morfológicas macro- e microscópicas que afetam a área e a distância de troca na placenta de conceitos derivados de embriões produzidos *in vitro* estejam mais associadas a um aumento no transporte de glicose e à síntese e acúmulo de frutose no plasma fetal e nos fluídos associados durante o terço final da gestação em conceitos derivados de FIV (BERTOLINI et al., 2004). Em um estudo comparativo entre conceitos bovinos derivados *in vivo* ou *in vitro*, analisados no final do primeiro (Dia 90) e segundo (Dia 180) terços de gestação e no período neonatal imediato, não foram observadas diferenças nas concentrações de glicose no plasma materno e fetal entre os grupos nos períodos gestacionais estudados (BERTOLINI et al., 2004). Da mesma forma, nenhuma diferença na abundância relativa de transcritos para componentes importantes do sistema de transporte de glicose (Glut-1, -3 e -5), que caracterizam a permeabilidade placentária à glicose (Glut-1 e -3) e à frutose (Glut-5), foi detectada em nível placentário de gestações derivadas de FIV em relação a gestações derivadas de embriões produzidos *in vivo*. Por outro lado, é comum que placentas de conceitos de FIV ou de TNCS sejam morfolologicamente e histologicamente afetadas e diferentes de controles durante a gestação, com as maiores aberrações sendo mais visíveis do meio para o final da prenhez (BERTOLINI et al., 2007; MIGLINO et al., 2007). Observações comuns em conceitos ovinos e bovinos de FIV e de TNCS no final da gestação e a termo incluem placentomegalia, reduzido número de placentônios, presença de placentônios gigantes, achatados e/ou adelgaçados, edema, dilatação umbilical, epitélio uterino achatado, aumento de tecido conjuntivo fetal, reduzida densidade celular, e dilatação e densidade vascular, imaturidade vascular, redução na vascularização e vasculogênese vilar, hipoplasia e perda de diferenciação do epitélio trofoblástico, hemorragia trofoblástica e vilar, aumento da densidade de células picnóticas fetais, entre outros achados (BERTOLINI et al., 2002b; BERTOLINI et al. 2004; LEE et al., 2004; BATCHELDER et al., 2005; MILES et al., 2005; BERTOLINI et al., 2006; CONSTANT et al., 2006; FLETCHER et al., 2007; PALMIERI et al., 2007). Ainda, distinções significativas na estrutura e arquitetura

microvascular em placentas de clones bovinos foram bem demonstradas no trabalho de Miglino et al. (2007), com a descrição de fusões placentárias, áreas extensas com ausência de placentação e hemorragias e um aumento no número de microcotilédones funcionais e acessórios. Entretanto, os achados mais significativos daquele estudo se referiram à presença de criptas carunculares dilatadas que acomodavam mais de uma vilosidade primária, com a ausência de complexos capilares densos e dilatações sinusóides em placentas de clones. Em síntese, a observação de anormalidades na vascularização, remodelação tecidual, diferenciação e maturação do tecido placentário, além do padrão anormal macroscópico, podem ser a causa primária de múltiplos problemas de desenvolvimento em prenhez de conceitos derivados de PIV que afetam o controle homeostático e homeorrético pré- e pós-natais (BERTOLINI et al., 2007), conduzindo possivelmente a uma maior captação, transporte e/ou partição da glicose no tecido placentário (BERTOLINI et al., 2004).

Placentônios aumentados em tamanho tendem a conter um aumento na densidade de células trofoblásticas binucleadas, o que pode ser evidenciado indiretamente pela mensuração de produtos de secreção específicos para estas células, como o lactogênio placentário (BERTOLINI et al., 2006). Normalmente, as células binucleadas compreendem cerca de 20% das células trofoblásticas e produzem produtos bioativos importantes para a regulação do desenvolvimento e do crescimento fetais, incluindo o lactogênio placentário bovino (bLP) e glicoproteínas como a proteína B específica de gestação de bovinos (PSPB). Em gestações de bovinos derivadas de FIV, demonstrou-se uma maior biodisponibilidade de lactogênio placentário bovino e glicoproteínas específicas de gestação no plasma materno, fetal e no neonato, o que foi correlacionado a fetos, neonatos e placentas e membranas fetais aumentadas em relação aos controles (BERTOLINI et al., 2006). As funções do lactogênio placentário têm sido relacionadas com o crescimento fetal. Conforme Anthony e colegas (1995), há indícios de que as ações de lactogênio placentário estimulem a captação fetal de aminoácidos, a síntese de glicogênio e a secreção de IGF-2 pelo feto, o que contribui para estimular o crescimento fetal. Conforme proposto por Ingermann (1987), o lactogênio placentário é proposto como promotor de um aumento na transferência transplacentária de glicose por aumentar o gradiente de concentração de glicose através da placenta, aumentando a concentração plasmática materna de glicose e reduzindo a concentração plasmática fetal deste carboidrato. De fato, utilizando um modelo de camundongos com *knockout* para o promotor placentário do gene IGF-2 (*Igf2 P0_/_ null*), foi demonstrado que o transporte placentário de glicose e aminoácidos

aumenta em resposta à expressão placentária de IGF-2, e que este aumento de transporte ocorre, pelo menos em parte, por causa do aumento da expressão dos genes *Slc2a3* e *Slc38a4*, membros com caráter de *imprinting* da família gênica do System A de transporte de aminoácidos, e do gene *Slc2a3*, também *imprinted* para uma das isoformas do GLUT-3 (CONSTÂNCIA et al., 2005). Uma maior transferência transplacentária de glicose vai ao encontro com as observações de desvios fisio-metabólicos em gestações derivadas de embriões produzidos *in vitro*, as quais resultaram em maiores níveis plasmáticos maternos de lactogênio placentário bovino e proteínas específicas da gestação, e acabaram resultando em elevado peso ao nascer e em elevadas concentrações plasmáticas neonatais de frutose (VASQUES et al., 1995; SCHMIDT et al., 1996; BERTOLINI et al., 2006).

2.4 IMPACTOS DA HIPERFRUTOSEMIA NEONATAL EM BOVINOS

Neonatos bovinos derivados de manipulações *in vitro* podem apresentar aumentadas concentrações plasmáticas de frutose logo após o parto, o que está relacionado ao peso ao nascer e parece ser uma consequência de alterações no padrão fisiológico metabólico pré-natal da placenta (BERTOLINI et al., 2004; BATCHELDER et al., 2007). Como todos os substratos necessários para o crescimento e desenvolvimento feto-placentário são originários do sistema materno, com os substratos que chegam ao feto sendo invariavelmente transportados, metabolizados e modificados pela placenta (BERTOLINI et al., 2004), um maior aporte de glicose ao conceito pode levar a uma atividade frutogênica mais intensa no período pré-natal, levando por sua vez à hiperfrutosemia neonatal aguda.

Em humanos e em animais, a frutose, quando presente na circulação, pode ser utilizada para aumentar a glicemia, pelas vias frutolítica da frutoquinase, seguida pela via gliconeogênica. A frutose é metabolizada mais rapidamente no fígado do que a glicose, pois sofre a ação catalisadora da enzima frutoquinase, contornando etapas regulatórias da via glicolítica (MAYES, 1993; BENDER, 2009a). O plasma de neonatos bovinos absolutamente grandes oriundos de produção *in vitro* podem apresentar concentrações aumentadas de frutose nos primeiros 60 min pós-parto (BERTOLINI et al., 2004). Em neonatos, é comum haver uma queda na glicemia nas primeiras horas de vida, seguida da elevação e normalização com o passar do tempo. Porém, em animais derivados de PIV e com hiperfrutosemia neonatal, os níveis de frutose plasmática rapidamente caem, havendo uma estrita correlação negativa com a elevação da glicemia ao longo do tempo

(BERTOLINI et al., 2004). Esta correlação negativa entre as concentrações de frutose e glicose no plasma neonatal sugere que o uso de frutose pode ter participação no aumento da glicemia de neonatos por gliconeogênese (BERTOLINI et al., 2004).

Os principais produtos do metabolismo hepático da frutose são a glicose, o glicogênio e o lactato (MAYES, 1993; BENDER, 2009a). Em condições fisiológicas, a frutose é rapidamente fosforilada e aprisionada nos hepatócitos na forma de frutose 1-fosfato, sendo a reação catalisada pela primeira enzima do metabolismo da frutose, a frutoquinase. Esta enzima, quando em alta atividade, possui a capacidade de metabolizar toda a frutose que chega ao fígado pela circulação. A frutose 1-fosfato é então clivada pela enzima aldolase B em gliceraldeído e fosfato de dihidroxiacetona, membros intermediários da rota da glicólise. O fosfato de dihidroxiacetona formado pode ser interconvertido em gliceraldeído-3-fosfato (GAP). A terceira enzima do metabolismo de frutose é a trioquinase, que catalisa a fosforilação de gliceraldeído para formar outra molécula de GAP, gerando $\text{NADH} + \text{H}^+$ na reação. A partir deste ponto, o GAP, que integra a rota glicolítica, pode continuar a degradação pelo metabolismo energético, ou pode servir de substrato para a gliconeogênese. A frutose atinge este estágio no metabolismo sem passar pelas etapas regulatórias que controlam a glicólise catalisada pela enzima fosfofrutoquinase. Desta forma, a frutose no fígado é rapidamente fosforilada, fornecendo aumentado substrato para rotas metabólicas como a síntese de lactato, glicólise, glicogênese, gliconeogênese, lipogênese e esterificação de ácidos graxos. Porém, se as concentrações de frutose plasmáticas estiverem elevadas, a metabolização para GAP é intensificada por não haver controle alostérico ou hormonal sobre esta rota, gerando excesso de $\text{NADH} + \text{H}^+$. Para recompor o equilíbrio na célula (NADH/NAD), o GAP é metabolizado ao piruvato, que por sua vez é convertido em lactato para a utilização do excesso de $\text{NADH} + \text{H}^+$. Este processo gerará lactato em relação direta à frutosemia, o que pode levar à acidose láctica e agravar qualquer situação de desbalanço ácido-base pré-existente, como a acidose respiratória por perturbações do sistema respiratório (MAYES, 1993).

Um indício de que a enzima frutoquinase pode estar ativa em neonatos bovinos reside na observação de Bertolini et al. (2004) de que, além da correlação negativa entre a queda de frutose e a elevação de glicose nas primeiras 12 h de vida sugerirem uma conversão de frutose em glicose, as concentrações de frutose e lactato no plasma de neonatos se equiparam no pós-parto e, por associação, ambas pareceram afetar o balanço ácido-base e a taxa respiratória, mais evidentemente em bezerros oriundos de FIV. De

acordo com o pH sanguíneo e com as concentrações plasmáticas de lactato, neonatos bovinos tendem a manifestar acidose láctica clínica durante a primeira hora pós-parto. Embora o pH sanguíneo se normalizou após a primeira hora de vida, níveis de lactato continuaram elevados em bezerros oriundos de produção *in vitro*, o que parece indicar produção continuada de lactato nestes animais (BERTOLINI et al., 2004). Já que a hiperfrutosemia pode causar acidose láctica, é possível que, uma vez normalizada a ventilação e uma vez reduzidos os níveis de frutose, a produção de lactato de origem da frutose seja diminuída, permitindo a normalização do equilíbrio ácido-base. É sabido que, em casos de acidose metabólica (como em um acúmulo de lactato), a compensação respiratória é geralmente retardada em poucas horas até que o bicarbonato presente no fluido cérebro-espinhal, no interstício cerebral e no plasma, reequilibre o pH. Conforme demonstrado por Bertolini et al. (2004), após o período inicial de acidose respiratória e metabólica, neonatos passaram por um período compensatório de alcalose respiratória, com um leve aumento no pH sanguíneo e uma ligeira queda na $p\text{CO}_2$ devido à taxa respiratória aumentada, sem diferenças nas concentrações plasmáticas de bicarbonato. Aumentos da taxa respiratória e da PO_2 foram detectados mais rapidamente em neonatos oriundos de produção *in vitro*, o que é sugestivo de que estes animais passam por acidose láctica, a qual é caracterizada, em humanos, por um pH sanguíneo igual ou menor a 7,25 e concentrações plasmáticas de lactato maiores do que 5 mM (SACKS, 1999). Entretanto, em casos de distúrbios respiratórios prolongados, a compensação respiratória fica impossibilitada, o que pode reduzir a sobrevivência destes animais.

A presença de altos níveis plasmáticos de frutose de origem placentária pré-natal em neonatos pode ser metabolicamente e clinicamente benéfica para adaptação na vida fora do útero, sob condições normais de ventilação e oxigenação, com a frutose potencialmente contribuindo para o reestabelecimento da glicemia no neonato, pela rota da frutoquinase até a formação de GAP, o qual segue então a rota gliconeogênica (BERTOLINI et al., 2004). Por outro lado, problemas respiratórios neonatais, que podem conduzir à hipóxia, hipercápnia e acidose respiratória, e condições de excessiva ativação da termogênese, atividade metabólica ou atividades físicas neonatais, que aumentam a demanda por ATP e intensificam a síntese de lactato e acidose láctica, podem ser agravados dramaticamente em decorrência da hiperfrutosemia, característica comum a bezerros nascidos de FIV ou TN. Isto ocorre porque, além do lactato oriundo da hiperfrutosemia, tecidos em condições de hipóxia também podem produzir lactato para satisfazer o metabolismo energético celular. Isto é verdadeiro para o músculo esquelético,

particularmente as fibras brancas, onde a taxa de trabalho e a conseqüente necessidade de formação de ATP podem exceder a taxa de oxigênio captado e utilizado. Outros tecidos que normalmente captam boa parte de sua energia da glicólise anaeróbica, produzindo lactato, incluem o cérebro, o trato gastrointestinal, a medula renal, a retina e a pele. O fígado, os rins e o coração geralmente captam o lactato e o oxidam pelo metabolismo intermediário, mas podem produzir este substrato sob condições de hipóxia (BENDER, 2009b).

Em resumo, a associação de elevada exigência energética pós-parto, a possibilidade de ocorrência de hiperfrutosemia em neonatos oriundos de FIV e TN e de hipóxia neonatal podem contribuir ainda mais para produção de lactato, o que resultará em acidose láctica e poderá contribuir para uma reduzida sobrevivência pós-parto. Porém, a frutose elevada, em condições de normóxia, também pode ser benéfica ao neonato, se esta fornecer os carbonos necessários via GAP para a síntese de novas moléculas de glicose no período pós-parto. Desta forma, torna-se oportuno avaliar a presença de atividade da rota de metabolização da frutose via enzima frutoquinase em neonatos bovinos oriundos da produção *in vitro* de embriões, bem como a relação da metabolização da frutose com a ocorrência de perturbações clínicas em casos de hiperfrutosemia e distúrbios respiratórios no período neonatal hebdomadal imediato.

3 CHAPTER ONE

3.1 INTRODUCTION

The *in vitro* fertilization (IVF) is one of the most important reproductive technologies currently in use for commercial, scientific and conservation purposes. From the animal production standpoint, the IVF procedures can be effectively used for the multiplication of animals of interest, for the increase of the reproductive lifespan of genetically valuable females, and for the optimization of the use of semen from expensive sires. On the other hand, from the scientific standpoint, this biotechnology can be used to study factors related to gamete biology, fertilization and embryo development, and to evaluate the impact of *in vitro* embryo production systems and *in vitro* embryo manipulations on subsequent pre- and post-natal development.

Over the past two decades, the IVF procedure has become a worldwide well-established and robust technique for the large scale *in vitro* production of bovine embryos. Brazil has been the leading country in the world in the application of such technology since the turn of the century, increasing the activity from 10 thousand to more than 260 thousand IVF embryos transferred from 2000 (THIBIER, 2001) to 2010 (STROUD, 2011). However, several developmental problems resulting from the use of such biotechnology are still being occasionally reported. The occurrence of lower pregnancy rates and higher rates of embryonic loss, abortion, dystocia, and peri- and neonatal mortality are common problems that contribute to lower efficiency and increased costs when the IVF procedure is applied to farm animal production (BEHBOODI et al., 1995; HASLER et al., 1995; MASSIP et al., 1996; BERTOLINI et al., 2002a). Several physiological deviations observed in calves derived from *in vitro* embryo production systems, such as higher birth weights, post-partum weakness, increased susceptibility to infection, and perinatal hypoxia, may reduce neonatal survival and suggest a disturbance in energy metabolism during the hebdomadal neonatal period (FARIN and FARIN, 1995, GARRY et al., 1996, SCHMIDT et al., 1996, KRUIP and DEN DAAS, 1997; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000). Furthermore, it is interesting to observe that some IVP-derived animals produced by IVF or somatic cell nuclear transfer (SCNT) procedures have increased fructose concentrations in the fetal plasma and associated fluids in the second half of gestation, and higher plasma fructose concentrations immediately after birth, which were correlated with higher birth weights and enlarged placentas (BERTOLINI et al., 2004; BATCHELDER et al., 2007). Such abnormalities might be a consequence of

changes in placental morphology and function that may affect conceptus metabolism and development during pregnancy, with an impact after birth (BERTOLINI et al., 2004; BATCHELDER et al., 2007).

High fructose plasma levels in the early neonatal period can be beneficial or detrimental to newborn calf survival. Fructose in physiologic levels can be favorable under normoxic conditions, potentially contributing to glucose homeostasis. Since the fructose metabolic pathway contributes to the glucose and lactate production via liver fructokinase, bypassing important regulatory steps of the glycolytic pathway (MAYES, 1993; BENDER, 2009a; DIGGLE et al., 2009), it is feasible that high fructose plasma concentrations can be metabolic and clinically beneficial to adaptation to life *ex utero*, contributing to an increase in glycemia in newborn calves. In fact, a negative correlation observed between fructose and glucose concentrations in the plasma of newborn calves suggests that plasma fructose can contribute to the increase of glycemia during the first hours of life (BERTOLINI et al., 2004). On the other hand, it is also suggested that under hypoxia caused, for instance, by neonatal respiratory distress, neonatal normo- or hyperfructosemia can cause significant metabolic consequences, such as lactic acidosis, which can compromise post-natal survival (BERTOLINI et al., 2004). Indeed, the latter authors have shown that plasma fructose and lactate concentrations were related with one another, with both appearing to affect the acid-base balance and respiratory rate in newborn calves, which was more evident in larger, IVF-derived newborn calves. Taken together, such observations suggest that the fructose metabolic pathway is active during the neonatal period in cattle, and the possibility of the existence of such metabolic and biochemical relationships may be especially important to calves derived from IVP procedures, since some IVF- and SCNT-derived animals have impaired intermediate metabolism and increased susceptibility to hypoxia during and after parturition (GARRY et al., 1996; SCHMIDT et al., 1996).

Despite the evidence suggesting that the fructose metabolic pathway is active in newborn calves, studies ascertaining the actual activity and the effects on the immediate neonatal period in cattle are lacking. Hence, we hypothesize that the enzymatic pathway of the fructose metabolism is active and functional in the liver of newborn calves, with the fructosemia levels being either detrimental or beneficial to the animal survival depending on the blood oxygen levels. Thus, the aims of this study were to investigate the effects of levels of plasma fructose and its metabolic activity on the health status of *in vitro*- and *in vivo*-derived newborn calves and on the adaptation to life *ex utero* in the first 24 h of life.

3.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.1 Animal facilities and experimental animals

The experiment was carried out in the cattle facilities at the Experimental Station of the *Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Estado de Santa Catarina* (EPAGRI) in Lages, SC, Brazil. From October 2010 to February 2011, nine pregnant heifers gave birth to four *in vitro*-produced and five *in vivo*-derived Flemish calves, which were used for the study.

3.2.2 Bovine embryo production

Bovine *in vivo*- and *in vitro*-derived blastocysts were produced by superovulation (SOV) and by *in vitro* fertilization (IVF) procedures, respectively, according to modified procedures by Bertolini *et al.* (2002a) and Ribeiro *et al.* (2009). The same Flemish sire was used for the production of both *in vivo*- and *in vitro*-derived embryos.

3.2.2.1 *In vitro* embryo production

Cumulus-oocyte complexes (COCs) were obtained from adult Flemish donor females by ovum pick up according to procedures by Pieterse *et al.* (1988) and Seneda *et al.* (2003). Briefly, COCs were *in vivo*-aspirated from ≥ 3 -mm follicles using an ultrasound device coupled with a 6.0 MHz linear transducer (100 Falco[®], Pie Medical, Netherlands) attached to a custom designed transvaginal device (Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda., Brazil). For the aspirations, 21G needles were connected through a silicone tubing (Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda., Brazil) to a 50-mL conical tube containing D-PBS supplemented with 25.000 IU/L sodium heparin (Hepamax-S[®], Blausiegel, Brazil). Aspirations were performed at a vacuum pressure by an infusion pump (Nutrimat II[®], B/Braun, Brazil) corresponding to a fluid flow of 10–20 mL/min.

Retrieved COCs were morphologically evaluated by stereomicroscopy and submitted to *in vitro* maturation (IVM) in groups of 10 to 15 selected COCs in 50 μ L drops of IVM medium under mineral oil for 22 to 24 h, at 39°C, and 5% CO₂ in humidified air. The IVM medium was composed of TCM-199 supplemented with 26.2 mM NaHCO₃, 0.2 mM sodium pyruvate, 0.5 μ g/mL FSH, 5 μ g/mL LH and 10% estrous mare serum.

After IVM, COCs were co-incubated with 2×10^6 sperm cells/mL in 50 μ L drops containing Fert-TALP medium supplemented with 30 μ g/mL heparin, 0.72 μ g/mL penicillin, 0.26 μ g/mL hypotaurine and 0.04 μ g/mL epinephrine (PARRISH et al., 1988), for 18 to 22 h, according to Vieira et al. (2002). For sperm cell segregation and *in vitro* sperm capacitation, sperm cells were selected in a discontinuous Percoll[®] gradient (45%-90%) in 1.8 mL microcentrifuge tubes submitted to centrifugation at 13100 RPM for 2 min. After centrifugation, the supernatant was discarded and the pellet was centrifuged in Sperm-TALP medium (PARRISH et al., 1988) for 45 s. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in approximately 50 μ L of Fert-TALP medium. A sample was evaluated for motility, and the sperm cell concentration was adjusted with Sperm-TALP. Following IVF, groups of 10 to 15 cumulus-free presumptive zygotes were *in vitro*-cultured in 50 μ L drops in SOFaaci culture medium (HOLM et al., 1999) supplemented with 5% estrous mare serum, under mineral oil, at 39°C, 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ for seven days.

3.2.2.2 *In vivo* embryo production

In vivo-produced embryos were obtained after superovulation (SOV) and artificial insemination (AI) of Flemish donor females. Briefly, donor females received a progesterone-releasing intravaginal device (PRID[®], Ceva Sante Animale, France) and a 2-mg dose of estradiol benzoate (Estrogin[®], Farmavet, Brazil) IM on Day 0 of the SOV protocol. On Day 4, 250 to 350 mg of FSHp (Folltropin[®]-V, Bioniche Animal Health Inc., Canada) were given IM in decreasing doses, twice a day, for 4 days (20% of the total dose x 2 on Day 4; 15% x 2 on Day 5; 10% x 2 on Day 6; 5% x 2 on Day 7). A dose of PGF_{2 α} analog (*d*-cloprostenol, Prolise[®], Arsa S.R.L., Argentina) was given IM to the donors along with the sixth and seventh FSHp doses, and on Day 6, the progesterone-releasing intravaginal devices were removed. On Day 8, estrus behavior was observed four times a day, with the AI performed 12 and 24 h after the onset of estrus. Embryos were non-surgically collected on Day 7 of development.

3.2.3 Embryo transfer, and pregnancy and gender diagnoses

Fresh Day-7 *in vivo*- and *in vitro*-produced blastocysts were nonsurgically transferred to recipient nulliparous females (*Bos taurus* beef crosses) with the estrous cycle synchronous (± 12 h) to the donors. Pregnancy and fetal gender diagnoses were carried out by ultrasonography, per rectum, on days 30 and 60 of gestation, respectively. Pregnancies were monitored once a month by ultrasonography and/or by rectal palpation. All recipients were maintained under the same environmental, nutritional and general management conditions for the entire experiment.

3.2.4 Parturition and delivery protocol

During the two weeks preceding the expected delivery dates, the parturient dams were observed every four hours for signs of parturition and changes in behavior. Then, parturition was induced as described elsewhere (Rezende et al., 2009). Briefly, nine *Bos taurus* pregnant recipient dams were housed in pairs around 15 days prior to the expected day of parturition (280 days), being fed twice a day. An IM dose of 8 mg of triamcinolone acetonide (Retardoesteróide[®], Hertape Calier, Brazil) was given on Days 266 to 271 of gestation, followed seven days later by the IM administration of 25 mg dexamethasone acetate (Azium[®], Schering, Brazil) and 0.5 mg PGF_{2 α} analogue (cloprostenol sodium, Sincrocio[®], Ouro Fino, Brazil). Delivery occurred from Days 274 to 279 of gestation.

Around the time of parturition, 20 to 24 h after the hormonal induction, a vaginal examination was performed to assess calving difficulty based on cervical dilatation, fetopelvic proportions and the fetal presentation, position and posture (fetal static). Obstetric procedures were employed to commensurate the clinical needs for each individual parturient female, when in labor. After delivery, and when released, fetal membranes (FM) were collected, weighted, inspected, and dissected, with the linear measurement (length and width) of the opened choriallantoic and the amniotic sacs. The total cotyledonary number and the length and width of each cotyledon in the fetal horn and nonfetal horn were also recorded for the determination of the total cotyledonary surface area.

3.2.5 Clinical care, evaluation of activity level, and measurements of physical traits in newborn calves

Upon delivery, calves were rubbed vigorously with towels, being subsequently weighted and positioned in sternal recumbence on a blanket; the umbilical cord was dipped in an iodine solution (7%). Within the first 3 h from birth, 2 L of frozen/thawed colostrum were fed by bottle or by esophageal intubation (in cases when calves that did not have the suckling reflex), with additional 2-3 L provided up to 18 h of life. Colostrum from mature cows was previously collected, analyzed for immunoglobulin concentration by specific gravity, and only colostrum with 80 to 140 mg/mL of protein was stored frozen. Time-to-stand and time-to-release meconium were recorded. Physical traits (crown-mouth length, crown-rump length, heart girth circumference, foreleg length, hind leg length) were measured and recorded.

3.2.6 Collection of blood, tissue, fetal membranes and urine samples

Within the first five minutes of life, the basic clinical signs (body/rectal temperature, respiratory rate, and heart rate) were recorded from each newborn calf. At five minutes of life ($t = -5$), neonatal venous blood samples were collected by venipuncture from the right jugular vein. At ten minutes of life (which was considered $t = 0$), a bolus infusion of 10 mg/mL D-[U- $^{13}\text{C}_6$]-fructose (Sigma-Aldrich Co., USA) in saline solution was performed into the left jugular vein at a dose of 10 mg/kg BW for future analysis. Additional blood samples were subsequently collected at 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, and 360 min, and at 12 and 24 h ($t = +20, +30, +45, +60, +90, +120, +180, +240, +360, +12$ and $+24$, respectively) after birth (or in relation to the fructose infusion, respectively). Blood samples (~20.0 mL) were taken in Vacutainer[®] tubes containing sodium heparin (BD Medical, USA), and immediately sent to the laboratory to be immediately centrifuged, with plasma aliquots stored in 2.0-mL microcentrifuge tubes (Axygen Inc., USA) at -80°C (pending analysis for D-fructose, D-glucose and L-lactate concentrations). Additional blood samples (~1.0 mL) were drawn at $t = -5, +5, +30, +60, +120, +240$ and $+360$ min in 3.0-mL heparinized (sodium heparin, Eurofarma, Brazil) syringes (BD Medical, USA), which were cooled to 0°C and immediately sent to the biochemistry lab (*Hospital Nossa Senhora dos Prazeres*, Lages, SC, Brazil) for blood gases, electrolyte concentrations, and acid-base balance analyses. Finally, additional 8-mL blood samples were collected at $t = -$

5, +5, +30, +60, +120, +240, +360 min and +24 h in 4-mL Vacutainer[®] tubes containing EDTA (BD Medical, USA), and in 4-mL Vacutainer[®] tubes without anti-coagulant (BD Medical, USA) for blood chemistry analyses. All blood samples were placed on ice after collection to be sent immediately to the laboratory. Rectal temperature, respiratory rate and heart rate were recorded prior to each blood sampling. In addition to blood sampling, samples of fetal fluids (allantoic and amniotic fluids) obtained during delivery, and urine collected from the first micturition, were separated in 2.0-mL microcentrifuge tubes (Axygen, USA) and stored frozen at -20°C for D-fructose analysis.

Within the first hour after birth, newborn calves were subjected to liver biopsy procedures to verify the relative abundance of gene transcripts for the enzymes of the fructose pathway (fructokinase, aldolase B, and triokinase); for the glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH), the enzyme that links the fructose metabolic pathway to glycolysis; and for two lactate dehydrogenase isoforms (LDH-A and LDH-B) responsible for the pyruvate conversion into lactate (Figure 1). In brief, after proper surgical preparation, local anesthesia with 2% lidocaine hydrochloride (Anestésico L[®], Pearson, Brazil) and asepsis, a small fragment of liver tissue was collected by the introduction of a 14-G needle through the 12^o right intercostal space into the abdominal cavity and through the liver tissue. The tissue fragments were placed in cryotubes containing RNAlater[™] (Qiagen, USA) and frozen at -80°C.

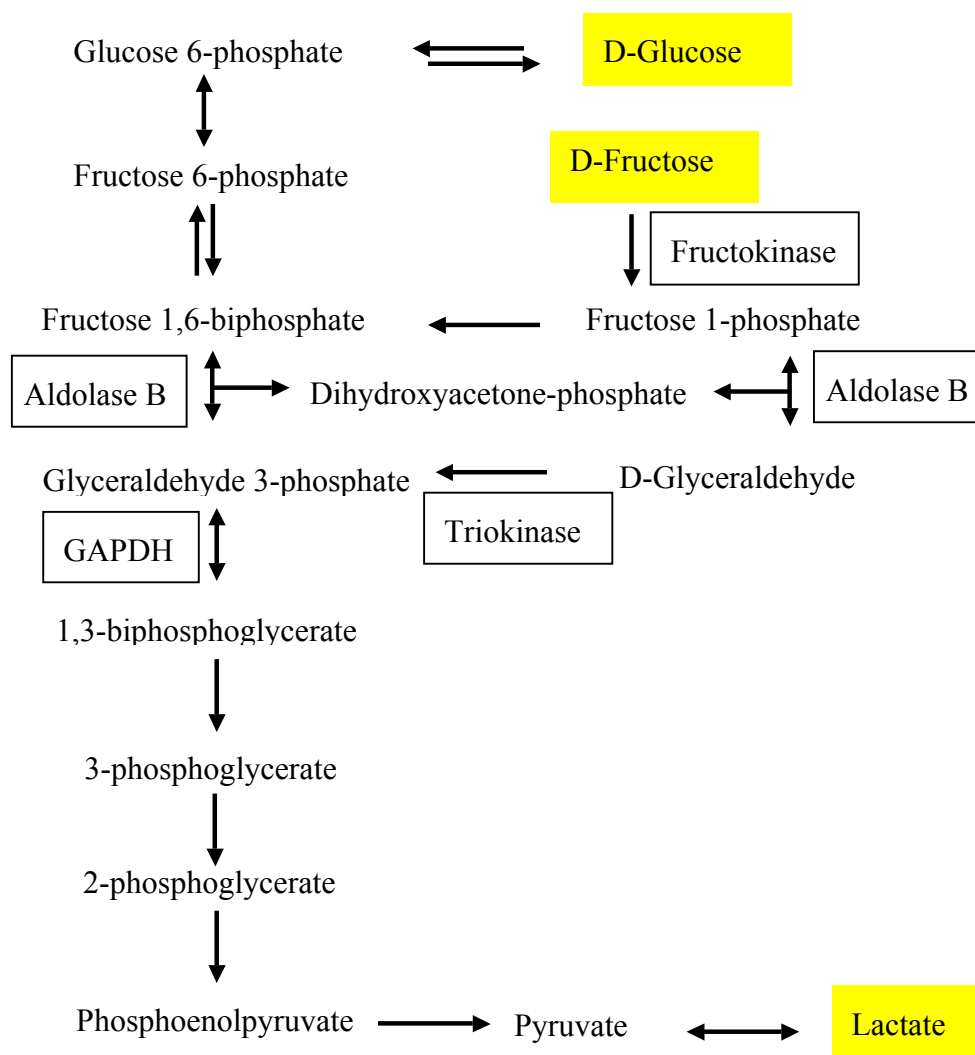


Figure 1. Simplified diagram of the intersection between the fructose metabolic pathway and the glycolytic pathway, with the presentation of the liver enzymes used for the gene expression analyses and the main energy substrates analyzed in the newborn plasma (highlight) of *in vivo*- and *in vitro*-derived calves. Source: Mayes, 1993.

3.2.7 D-Fructose, D-glucose and L-lactate measurements and lipid metabolic profile in sampled fluids

The determinations of plasma glucose and lactate concentrations were carried out in duplicates (Biochemistry Lab, Núcleo de Atenção Médica Integrada, UNIFOR, Fortaleza, CE, Brazil) in an automated biochemical analyzer (Labmax 240, Labtest Diagnostica, Brazil). Also, as substrate analyses (including glucose levels) were performed at a later time, a drop of blood from each collected sample, taken immediately after blood collection, was used to measure blood glucose, as reference values for clinical purposes, in a glucose meter device (Optium[®], Abbot Laboratories, U.S.A.). In addition, to verify the lipid metabolic profile, plasma was submitted to the analyses of triglyceride, total

cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), very-low density lipoprotein (VLDL) and low-density lipoprotein (LDL) concentrations (Biochemistry Lab, Núcleo de Atenção Médica Integrada, UNIFOR, Fortaleza, CE, Brazil), in duplicates, in an automated biochemical analyzer (Labmax 240, Labtest Diagnostica, Brazil).

Plasma, fetal fluids (allantoic and amniotic fluids) and urine from the first micturition were submitted to fructose determination (Molecular and Developmental Biology Lab UNIFOR, Fortaleza, CE, Brazil) by the colorimetric method described by Taylor (1995). Briefly, 10 μ L of each fluid sample or standard solution (0, 25, 50, 100, 200 and 400 mg/dL) were placed in 2.0-mL microcentrifuge tubes (Eppendorf, Germany), in triplicates; then, 32 μ L of the reagent solution composed of 10 mM tryptamine hydrochloride [3-(2-amino-ethyl) indole HCl] in 0.1 M HCl was added to each tube, followed by the addition of 1.8 mL HCl at 12 N. Tubes were shut closed and placed in a 60°C water bath for 15 min, being rapidly cooled to 4°C in water for 2 min; then, samples were placed in a 20°C water bath for 38 min. The content of each tube was placed in two polystyrene cuvettes (PlastiBrand®, Germany) so that each sample could render six optical readings (triplicates x 2). The absorbance was read in a spectrophotometer (Ultrospec 1100 PRO®, Amersham Biosciences, USA) adjusted to 518 nm wavelength. Due to the high fructose concentrations in some fluid types and samples, blood samples, fetal fluids and urine were diluted in water in a proportion of 1:2, 1:4, and 1:10, respectively. Samples with a difference higher than 5% in the intra-assay coefficient of variation were re-analyzed.

Plasma samples and urine will be subjected to mass spectrometry for the analysis of the appearance of ^{13}C in glucose and/or lactate molecules, which will determine the functionality of the fructose metabolic pathway at birth, and the fructose involvement in the intermediate metabolism. Such analyses are still pending.

3.2.8 Physiological and biochemical analyses in the blood of newborn calves

To verify the acid-base status in the blood of newborn calves in the first 6 h of life, blood samples collected in heparinized syringes were submitted to the analyses of blood gases (pCO_2 , pO_2 , O_2 saturation), acid-base balance parameters (pH, HCO_3^- , BE), and electrolyte concentrations (Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{+2}) at the *Hospital Nossa Senhora dos Prazeres* (Lages, SC, Brazil), in an automated Omni® C Blood Gas Analyzer (Roche Diagnostics, USA). Blood samples collected in EDTA tubes and serum collected in tubes without anti-coagulant were submitted to biochemistry analyses (*Hospital Nossa Senhora*

dos Prazeres, Lages, SC, Brazil) in an A25-Autoanalyzer[®] Automated spectrophotometer (Biosystems, Spain), including the analysis for liver function (total plasma protein, albumin, alkaline phosphatase, alanine transaminase - ALT, aspartate transaminase - AST, gamma glutamyl transferase – GGT, total bilirubin, and direct and indirect bilirubin); for muscle function (creatine phosphokinase - CPK); for kidney function (blood urea nitrogen, and creatinine); and phosphate (PO_4^-). Also, to compare full blood hematologic parameters between *in vitro*- and *in vivo*-derived newborn calves during the first hours of life, the total red blood cell count (RBC), packed cell volume (PCV), hemoglobin (Hb), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin (MCHC), red blood cell distribution width (RDW), white blood cell counts (including leukocytes, lymphocytes, monocytes, eosinophils, and neutrophil granulocytes, subdivided in segmented and banded neutrophils), and platelet numbers were measured in EDTA-preserved blood samples in a Cell-Dyn 1700[®] Hematology Analyzer (Abbott Diagnostics, USA).

3.2.9 Gene expression analysis of key enzymes in the fructose (fructokinase, aldolase B, triokinase) and glycolytic pathways (GAPDH, LDH-A and LDH-B)

Quantitative PCR (qPCR) was performed to verify the relative abundance and differential expression of gene transcripts for the three enzymes of the fructose pathway (fructokinase, aldolase B, and triokinase), for GAPDH and for LDH-A and LDH-B in liver samples collected within the first hour of life of *in vivo*- and *in vitro*-produced newborn calves.

3.2.9.1 RNA extraction

Liver tissue samples collected from all newborn calves were placed in cryotubes (Nunc, Denmark) containing RNAlater[™] (Qiagen, USA), and stored at -80°C. For RNA extraction, tubes were thawed; the contents (tissue and RNAlater[™]) were transferred to a 1.5-mL microcentrifuge tube (Axygen, USA) and centrifuged at 14,000 x g for 3 min at 4°C. Then, the RNAlater[™] was completely removed and 200 µL PBS were added to wash the tissue sample. Samples were then centrifuged at 14,000 x g for 2 min at 4°C; the PBS supernatant was completely removed, with a subsequent addition of 200 µL Trizol[®] reagent (Invitrogen, USA). The content was transferred to a cryotube, homogenized with a

TissueRuptor[®] (Qiagen, USA), and transferred again to a 1.5-mL microcentrifuge tube where additional 800 μ L Trizol[®] reagent were added. After a 5-min sample incubation at RT, 200 μ L chloroform was added, mixed for 15 s, and incubated for 2-3 min at RT. Then, samples were centrifuged at 12,000 x g for 15 min at 4°C. Following centrifugation, the colorless upper aqueous phase was removed and transferred to a 1.5-mL microcentrifuge tube, where 500 μ L 100% isopropyl alcohol was added to the sample for RNA precipitation. Samples were incubated at RT for 10 min and then centrifuged at 12,000 x g at 4°C for 10 min. The supernatant was removed and the pellet was washed with 1 mL 75% ethanol in DEPC-treated water. Samples were briefly vortexed and centrifuged at 7,500 x g at 4°C for 5 min. The supernatant was removed and the RNA pellet was dried for 5 to 10 min in a laminar flow. Then, the RNA pellet was dissolved with 20-30 μ L DEPC-treated water. The total RNA was quantified using a ThermoScientific Evolution 600 UV-Vis Spectrophotometer with the nanocell accessory.

3.2.9.2 cDNA synthesis and qPCR

The cDNA was synthesized using 300 ng total RNA extracted from each liver samples, with the SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System kit (Invitrogen, USA) and the oligo(dT). Primers specific to the bovine sequences for β -actin, fructokinase, aldolase B, triokinase, GAPDH, LDH-A and LDH-B (Table 1) were designed using the Primer-BLAST software package from the National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD, USA). For the qPCR analyses, 700 ng cDNA for each gene of interest, 5 μ M of each primer, and Power SYBR Green PCR Mastermix added according to the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems, USA) were used in the iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA). The PCR run was set for a cycle at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 1 min, 60°C for 1 min, and 72°C for 1 min. In the melting curve, the temperature decreased from 95°C to 62°C at 0,5°C/30 s. The Cts of the triplicates from each gene were normalized with the Cts of the β -actin housekeeping gene.

Table 1. Genes of interest, primer DNA sequences and Gene Bank accession numbers for genes analyzed in liver samples from *in vivo*- and *in vitro*-derived newborn calves.

Transcripts	Primer sequences (5' - 3')	Accession numbers
β -actin	F - GGACTTCGAGCAAGAGATGG	NM_173979.3
	R - ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	
Fructokinase	F - GGAGACCCCGTGCTCTTGTTGC	NM_001076351.1
	R - TCCGGCCCTCAATGTGGATCC	
Aldolase B	F - CCCATCTTGCTATCCAGGAA	NM_001034485.1
	R - TACAGCAGCCAGGACCTTCT	
Triokinase	F - CCTAGTGGGCACCTTCATGT	NM_001024524.2
	R - TCTGCTTTGAGGCTTCACCT	
GAPDH	F - ATCACTGCCACCCAGAAGAC	NM_001034034.1
	R - GCTCAGGGATGACCTTGCCC	
LDH-A	F- GGAGCATGGTGACTCTAGTGTGCCT	NM_174099.2
	R- GGAAATCGGATGCACCCGCC	
LDH-B	F- AGATGGTGGTTGAGAGTGCCTATGA	NM_174100.1
	R- ACCTCTTCATCCTTCAGCTTCTGGT	

3.2.10 Data analyses

Quantitative data were tested for normality by the Shapiro-Wilk test and by the analysis of the skewness and kurtosis using the UNIVARIATE procedure of SAS (SAS, 2002), with non-normal raw data submitted to logarithm transformation [$\log(x+1)$]. Then, normal and normalized data were analyzed using the PROC MIXED of SAS (LITTELL et al., 1998). Non-normalized data, considered non-parametric (SAMPAIO, 2002), were compared by the Friedman test (SAMPAIO, 2002), for which the observations were first ranked by the PROC RANK of SAS (IPE, 1987), to be subsequently analyzed by the PROC MIXED of SAS. Data were also compared by ANCOVA, using birth weight as a covariate. Embryo origin (*in vivo*- or *in vitro*-derived) and/or time were considered as main effects. The repeated measures procedures of SAS were used for the analysis of the data as a function of time. Qualitative data were analyzed by the χ^2 test (Minitab, State College, PA, USA). Pearson's correlation test was used for the analysis of relationships between

traits, also using values corrected for the covariate and the other fixed effects (embryo origin and/or time).

3.3 RESULTS

Four *in vitro*-produced and five *in vivo*-derived Flemish viable calves were delivered on Days 276.3 ± 0.9 and 276.4 ± 0.8 of gestation, respectively, either vaginally (all dystocial, requiring traction and episiotomy procedures) or by cesarean section due to fetopelvic disproportions (absolutely large calves). Six calves, including all four IVF and two control newborn calves were delivered by cesarean sections, whereas three control calves were delivered by mild to moderate traction after episiotomy procedures. Two dams bearing IVF-derived calves and one bearing a SOV-derived calf retained the fetal membranes.

3.3.1 Neonatal physical, behavioral, clinical and biochemical characteristics upon birth

3.3.1.1 Physical and behavioral characteristics of neonates upon birth

Physical and behavioral characteristics of *in vivo*- and *in vitro*-derived newborn calves were registered. Birth weights (BW), and foreleg and hindleg lengths were greater ($P < 0.05$) in IVF- than in SOV-derived calves. However, no differences were observed between groups for crown-mouth and crown-rump lengths, heart girth circumference, total placentome number, placentome number in the fetal or nonfetal horns, placentome surface area (SA), time required to standing, and time elapsed to release meconium (Table 2). A trend, however, was observed for a larger cotyledonary SA in the nonfetal horn (156.5 ± 16.6 vs. 98.7 ± 13.6 cm²; $P = 0.074$), and heavier amniotic (1425.0 ± 206.5 vs. 660.0 ± 186.7 g; $P = 0.064$) and chorioallantoic membranes (7050.0 ± 762.3 vs. 4723.0 ± 622.4 g; $P = 0.099$) in IVF-derived FM than in control counterparts.

The adjusted values for total placentome number, number of placentomes in the fetal horn, and chorioallantoic membrane and FM weights were significantly related to birth weights, as observed when birth weight was used as a covariate. However, those FM traits were not significantly different between groups, demonstrating that the IVF procedures did not cause any asymmetric growth effect between the fetal and FM traits. Moreover, birth weights and crown-rump lengths were positively correlated with time to standing ($r = 0.99$,

P= 0.045; and $r= 0.86$, $P= 0.006$, respectively), irrespective of the group, being a more pronounced finding in *in vitro*-derived calves, i.e., calves with longer crown-rump lengths took longer to stand up. Also, time to standing and time to release meconium were positively correlated ($r= 0.99$; $P= 0.020$) only in IVF-derived calves.

Table 2. Physical and behavioral characteristics of *in vivo*- (SOV) and *in vitro*- (IVF) derived newborn calves upon birth (LSM $\pm$ SEM)

Traits*	Groups		P value
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	
Birth weight (kg)	49.9 $\pm$ 1.9 ^a	44.0 $\pm$ 1.7 ^b	0.054
Crown-mouth length (cm)	29.5 $\pm$ 0.7 ^a	29.2 $\pm$ 0.6 ^a	0.759
Crown-rump length (cm)	83.8 $\pm$ 2.5 ^a	79.8 $\pm$ 2.3 ^a	0.286
Heart girth circumference (cm)	81.5 $\pm$ 1.4 ^a	79.4 $\pm$ 1.2 ^a	0.289
Foreleg length (cm)	77.5 $\pm$ 0.6 ^a	75.2 $\pm$ 0.5 ^b	0.023
Hindleg length (cm)	77.25 $\pm$ 0.9 ^a	72.8 $\pm$ 0.8 ^b	0.009
Total placentome number	70.5 $\pm$ 14.96 ^a	97.3 $\pm$ 10.58 ^a	0.218
Placentome number - fetal horn	34.0 $\pm$ 15.82 ^a	54.5 $\pm$ 11.19 ^a	0.350
Placentome number - nonfetal horn	36.5 $\pm$ 5.2 ^a	42.8 $\pm$ 3.6 ^a	0.379
Placentome SA (cm ²)	19570.4 $\pm$ 3038 ^a	19046.3 $\pm$ 2148 ^a	0.895
FM weight (g)	8475.0 $\pm$ 730.1 ^a	5383.3 $\pm$ 596.1 ^b	0.046
Time to stand (min)	145.0 $\pm$ 42.8 ^a	117.8 $\pm$ 33.1 ^a	0.633
Time to release meconium (min)	171.3 $\pm$ 35.6 ^a	167.7 $\pm$ 41.1 ^a	0.950

^{a,b}: Numbers in the same row without common superscripts differ, $P<0.05$.

SA: surface area; FM: fetal membranes

* Data regarding placentomes and FM were based on recovered FM from two and four parturient females bearing IVF- and SOV-derived concepti, respectively

One of the IVF-derived calves had an enlarged umbilical cord (Figure 2) and was submitted to surgery for partial excision of the umbilicus to prevent omphalitis, omphaloflebitis, and ascendant infection.



Figure 2. Enlarged umbilicus in an *in vitro*-derived newborn calf immediately after delivery. This animal was the second largest calf at birth, born from one of the dams that retained the fetal membranes.

3.3.1.2 Concentrations of substrates in term fetal fluids collected at parturition, in neonatal plasma upon birth, and in urine from first micturition after birth

No differences were observed in the concentrations of D-fructose, D-glucose and L-lactate in the amniotic and allantoic fluids collected during calf delivery, in the neonatal plasma collected up to 5 min after birth, and in the neonatal urine collected at first micturition after birth (Table 3).

Table 3. Concentrations of D-Fructose, D-glucose and L-lactate in term fetal fluids collected at parturition, in neonatal plasma 5 min after birth, and in first urine (LSM $\pm$ SEM)

Concentration (mg/dL)	Groups		P value
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	
Plasma D-Glucose	65.5 $\pm$ 7.0 ^a	63.6 $\pm$ 6.3 ^a	0.845
Plasma D-Fructose	47.5 $\pm$ 11.3 ^a	71.6 $\pm$ 10.1 ^a	0.156
Plasma L-Lactate	119.4 $\pm$ 18.6 ^a	143.9 $\pm$ 16.6 ^a	0.359
D-Fructose in amniotic fluid	182.1 $\pm$ 53.0 ^a	199.0 $\pm$ 61.2 ^a	0.845
D-Fructose in allantoic fluid	398.5 $\pm$ 114.7 ^a	577.7 $\pm$ 114.7 ^a	0.311
D-Fructose in first urine	3343.0 $\pm$ 689.6 ^a	4486.0 $\pm$ 616.8 ^a	0.256

^{a,b}: Numbers in the same row without common superscripts differ, $P < 0.05$.

3.3.1.3 Analysis of gene expression for key liver enzymes for fructose metabolism in newborn calves upon birth

Irrespective of the group, results from the qPCR analysis indicated a high expression level, based on the relative transcript abundance, for the enzymes fructokinase (9.3 ± 3.3), aldolase B (8.5 ± 4.4), triokinase (10.0 ± 4.0), GAPDH (26.2 ± 11.3), LDH-A (8.6 ± 3.7), and a lower relative abundance for LDH-B (2.0 ± 0.9) in the liver of all newborn calves within the first hour of life. No differences were detected between groups for fructokinase (9.9 ± 6.8 vs. 11.5 ± 5.9 , $P=0.868$), aldolase B (17.8 ± 8.1 vs. 5.1 ± 7.0 , $P=0.290$), triokinase (17.0 ± 5.3 vs. 4.7 ± 4.6 , $P=0.138$), GAPDH (29.8 ± 22.5 vs. 22.4 ± 19.5 , $P=0.814$), LDH-A (17.0 ± 6.6 vs. 5.4 ± 5.7 , $P=0.241$), and LDH-B (1.2 ± 1.7 vs. 3.2 ± 1.5 , $P=0.431$) expression levels in the liver of *in vitro*- and *in vivo*-derived newborn calves, respectively, in the first hour of life (Figure 3), likely due to a high variability between animals.

Interestingly, the overall ratio between the relative abundance for transcripts for the enzymes fructokinase:aldolase-B:triokinase:GAPDH (F:A:T:G), irrespective of the groups, was approximately 1:1:1:4, and for GAPDH:LDH-A:LDH-B (G:LA:LB) was 16:4:1. However, the F:A:T:G and G:LA:LB enzyme ratios were approximately 1:2:2:6 and 4:1:1:9, and 48:12:1 and 6:2:1, respectively, in the liver of IVF- and SOV-derived newborn calves. As the important and limiting metabolic enzymes fructokinase and GAPDH had similar levels of expression between groups, and as the relative abundances for triokinase, aldolase B, and LDH-A were 3.2-, 3.5-, and 3.2-fold higher and for LDH-B was 0.4-fold lower in IVF-derived calves, such differences above may indicate an overexpression of triokinase, aldolase B, and LDH-A, and an underexpression of LDH-B in IVF-derived calves when compared with controls (Figure 3).

When birth weight was used as a covariate, adjusted values for aldolase B ($P=0.049$) at five minutes of life were significantly related to birth weights. However, values were not different between groups.

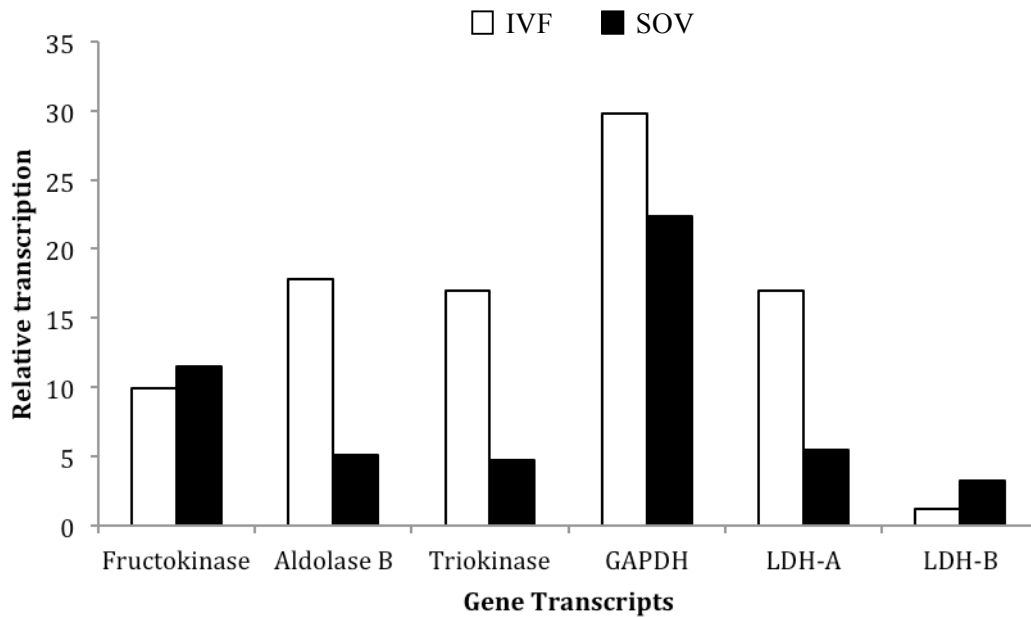


Figure 3. Relative abundance of transcripts for key enzymes related to the fructose metabolic pathway in the liver of IVF- and SOV-derived calves upon birth.

3.3.1.4 Clinical signs in newborn calves upon birth

At five minutes after birth, IVF-derived calves had lower respiratory rates than SOV-derived calves (53.3 ± 2.3 vs. 64.2 ± 2.1 breaths per min, $P= 0.009$), which may indicate a higher propensity to respiratory distress or, on the contrary, an easier pulmonary adaptation to the atmosphere immediately after birth. No differences were observed between IVF- and SOV-derived animals for body temperature ($39.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2$ vs. $39.6^{\circ}\text{C} \pm 0.2$, $P=0.542$) and hearth rate (128.5 ± 7.8 vs. 141.2 ± 7.0 beats per min), respectively (Figure 4).

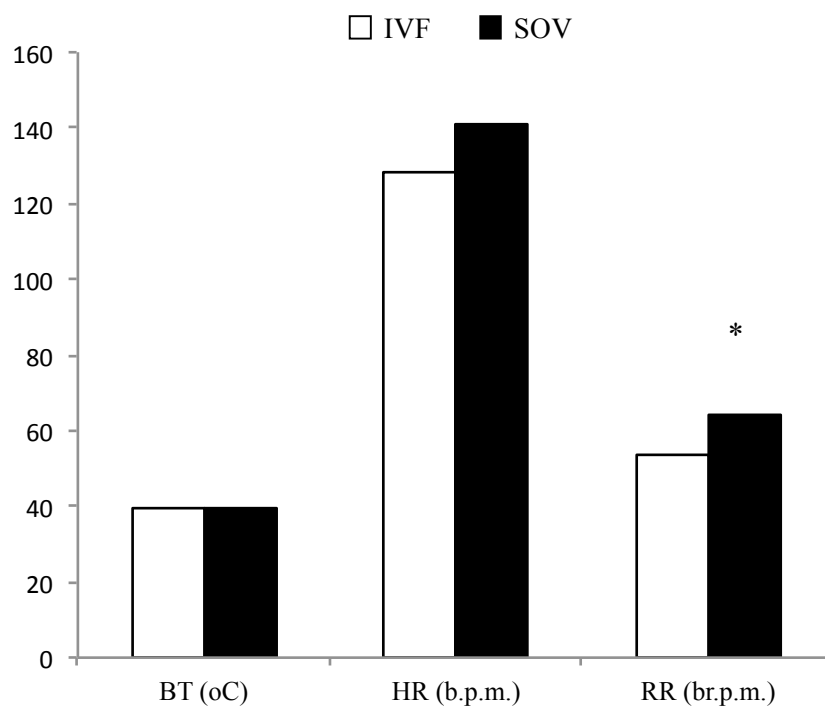


Figure 4. Body temperature (BT, °C), heart rate (HR, b.p.m.) and respiratory rate (RR, br.p.m.) in IVF- and SOV-derived newborn calves at five minutes after birth. *P<0.05.

Table 4. Blood gases, acid-base balance and electrolyte concentrations in IVF- and SOV-derived newborn calves upon birth (LSM $\pm$ SEM)

Parameters	Groups		P value
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	
pH	7.27 $\pm$ 0.02 ^a	7.29 $\pm$ 0.01 ^a	0.511
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	27.4 $\pm$ 0.9 ^a	27.3 $\pm$ 0.8 ^a	0.984
BE (mmol/L)	0.9 $\pm$ 0.8 ^a	-0.6 $\pm$ 0.7 ^a	0.868
O ₂ saturation rate (%)	25.4 $\pm$ 4.7 ^a	34.7 $\pm$ 4.2 ^a	0.267
pO ₂ (mmHg)	20.1 $\pm$ 1.9 ^a	24.0 $\pm$ 1.7 ^a	0.308
pCO ₂ (mmHg)	60.3 $\pm$ 2.8 ^a	58.2 $\pm$ 2.5 ^a	0.380
Na ⁺ (mmol/L)	137.3 $\pm$ 1.1 ^a	139.6 $\pm$ 1.0 ^a	0.205
K ⁺ (mEq/L)	4.2 $\pm$ 0.17 ^a	4.1 $\pm$ 0.15 ^a	0.258
Cl ⁻ (mEq/mL)	110.5 $\pm$ 4.5 ^a	101.9 $\pm$ 4.0 ^a	0.256
Ca ⁺² (mmol/L)	2.7 $\pm$ 1.0 ^a	2.6 $\pm$ 0.9 ^a	0.630
PO ₄ ⁻ (mmol/L)	1.9 $\pm$ 0.6 ^a	1.8 $\pm$ 0.5 ^a	0.399

^{a,b}: Numbers in the same row without common superscripts differ, P<0.05.

3.3.1.5 Blood chemistry analyses in newborn calves upon birth

3.3.1.5.1 Blood gases, acid-base balance and electrolyte concentrations in newborn calves upon birth

No differences were seen between groups for blood gases (pO_2 , pCO_2 , O_2 saturation rate), acid-base balance (pH, HCO_3^- , BE), and electrolyte concentrations (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , PO_4^{3-}) at five minutes of life (Table 4).

3.3.1.5.2 Liver, muscle and kidney functions in newborn calves upon birth

At five minutes of life, no differences were detected between groups for total plasma protein, albumin, alkaline phosphatase, total bilirubin, direct bilirubin, indirect bilirubin, ALT, AST, GGT, CPK, blood urea nitrogen and creatinine (Table 5), indicating that liver, muscle and kidney functions were in physiological normalcy in both groups at birth. When birth weight was used as a covariate, adjusted values for GGT ($P=0.085$) at five minutes of life tended to be related to birth weights. However, values were not different between groups.

Table 5. Concentrations of plasma components indicative of liver, muscle and kidney functions in IVF- and SOV-derived newborn calves upon birth (LSM $\pm$ SEM)

Parameters	Groups		P value
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	
Total protein (g/dL)	4.5 $\pm$ 0.2 ^a	4.3 $\pm$ 0.1 ^a	0.364
Albumin (g/dL)	2.2 $\pm$ 0.1 ^a	2.2 $\pm$ 0.1 ^a	0.861
Alkaline phosphatase (U/L)	140.0 $\pm$ 37.7 ^a	191.8 $\pm$ 33.7 ^a	0.193
Total bilirubin (mg/dL)	0.5 $\pm$ 0.1 ^a	0.4 $\pm$ 0.1 ^a	0.472
Direct bilirubin (mg/dL)	0.3 $\pm$ 0.04 ^a	0.1 $\pm$ 0.04 ^a	0.343
Indirect bilirubin (mg/dL)	0.3 $\pm$ 0.09 ^a	0.2 $\pm$ 0.08 ^a	0.685
ALT (U/L)	9.0 $\pm$ 1.7 ^a	8.3 $\pm$ 1.5 ^a	0.169
AST (U/L)	14.3 $\pm$ 6.7 ^a	21.5 $\pm$ 6.0 ^a	0.770
GGT (U/L)	9.1 $\pm$ 199.9 ^a	11.8 $\pm$ 178.8 ^a	0.329
CPK (U/L)	37.5 $\pm$ 317.4 ^a	136.7 $\pm$ 283.9 ^a	0.229
Blood urea nitrogen (mg/dL)	36.8 $\pm$ 5.9 ^a	36.6 $\pm$ 5.0 ^a	0.974
Creatinine (mg/dL)	2.7 $\pm$ 0.2 ^a	2.4 $\pm$ 0.2 ^a	0.400

^{a,b}: Numbers in the same row without common superscripts differ, $P < 0.05$.

3.3.1.5.3 Hematologic parameters in newborn calves upon birth

At five minutes of life, IVF-derived calves displayed higher ($p < 0.05$) mean values for MCHC, RDW, monocytes, eosinophils, and platelets than SOV-derived calves. However, no statistical differences were found between *in vitro*- and *in vivo*-derived animals for total red blood cells (RBC), PCV, Hb, MCV, MCH, leukocytes, lymphocytes, monocytes and banded neutrophils (Table 6).

Table 6. Hematologic parameters in IVF- and SOV-derived newborn calves upon birth (LSM $\pm$ SEM)

Parameters	Groups		P value
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	5.8 ± 0.5^a	5.9 ± 0.4^a	0.851
PCV (%)	24.2 ± 2.5^a	28.6 ± 1.9^a	0.280
Hb (g/dL)	9.7 ± 0.8^a	10.1 ± 0.6^a	0.782
MCV (fl)	41.5 ± 2.9^a	39.4 ± 2.3^a	0.677
MCH (pg)	16.7 ± 1.2^a	18.1 ± 1.0^a	0.601
MCHC (%)	40.3 ± 1.4^a	35.7 ± 1.1^b	0.059
RDW (%)	24.5 ± 1.9^a	23.2 ± 1.5^b	0.006
Leukocytes ($/\mu\text{L}$)	31267.0 ± 4975.4^a	20120.0 ± 3853.9^a	0.437
Lymphocytes ($/\mu\text{L}$)	7160.0 ± 1058.0^a	6361.6 ± 819.5^a	0.958
Monocytes ($/\mu\text{L}$)	2096.3 ± 380.1^a	952.8 ± 294.4^b	0.028
Eosinophils ($/\mu\text{L}$)	770.7 ± 169.9^a	101.6 ± 131.6^b	0.004
Banded neutrophils ($/\mu\text{L}$)	1580.7 ± 277.3^a	552.2 ± 214.8^a	0.284
Segmented neutrophils ($/\mu\text{L}$)	19659.0 ± 3785.8^a	12152.0 ± 2932.4^a	0.431
Platelets ($10^3/\mu\text{L}$)	681.3 ± 65.4^a	485.4 ± 50.7^b	0.041

^{a,b}: Numbers in the same row without common superscripts differ, $P < 0.05$.

When birth weight was used as a covariate, adjusted values for RDW ($P = 0.042$), segmented neutrophils ($P = 0.038$), leukocytes ($P = 0.050$), lymphocytes ($P = 0.002$), and monocytes ($P = 0.049$) at five minutes of life were significantly related to birth weights. In addition, lymphocyte counts were significantly lower (4492.0 ± 658.1 vs. 7930.0 ± 570.8 cells/ μL , $P = 0.013$) and RDW values tended to be higher (24.1 ± 0.2 vs. $23.4 \pm 0.2 \times 10^6$ cells/ μL , $P = 0.062$) in IVF-derived calves than in control counterparts. However, segmented neutrophil, leukocyte, and monocyte counts were not different between groups.

3.3.1.5.4 Lipid metabolism in newborn calves upon birth

At five minutes of life, IVF-calves had a trend for higher mean values for plasma HDL than SOV-derived animals (14.0 ± 1.3 vs. 10.8 ± 1.1 mg/dL, $P=0.082$), with no further differences between groups for plasma triglycerides (3.3 ± 2.0 vs. 2.8 ± 1.8 mg/dL, $P=0.725$), total cholesterol (33.5 ± 2.2 vs. 27.6 ± 2.0 mg/dL, $P=0.141$), LDL (19.3 ± 1.8 vs. 16.4 ± 1.7 mg/dL, $P=0.323$), and VLDL (0.7 ± 0.4 vs. 0.6 ± 0.4 mg/dL, $P=0.725$), respectively (Figure 5).

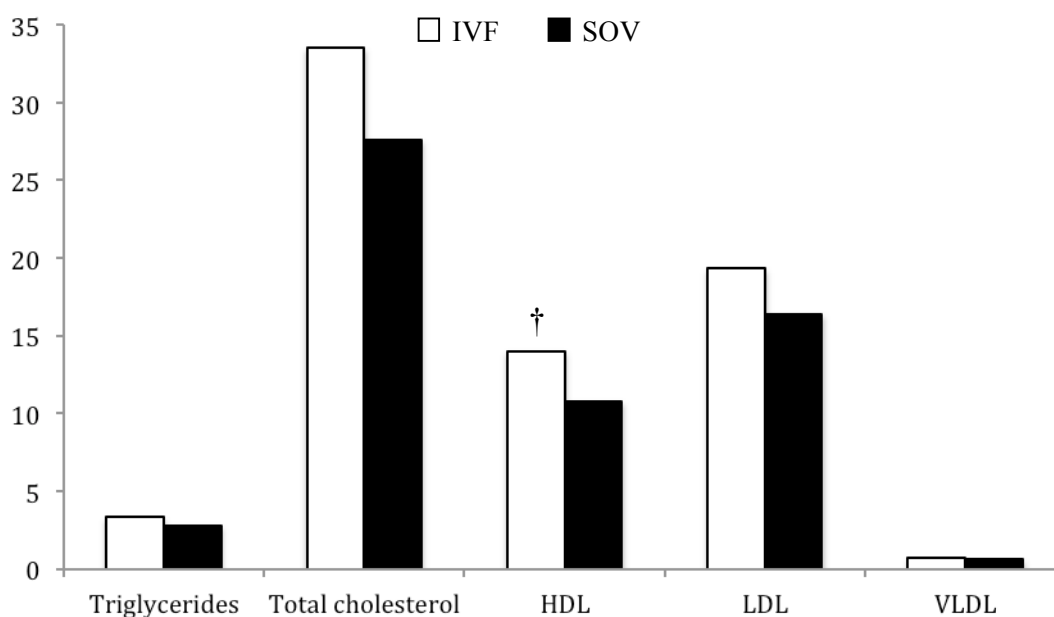


Figure 5. Components of the lipid metabolism in the plasma of IVF- and SOV-derived newborn calves at five minutes after birth. † $P<0.1$.

3.3.2 Neonatal physical, behavioral, clinical and biochemical characteristics in response to the adaptation to life *ex utero* from birth to 24 h after birth

3.3.2.1 Plasma concentrations of D-glucose, D-fructose and L-lactate in newborn calves from birth to 24 h of life

In an overall comparison of mean values during the first 24 h of life, IVF-derived calves had lower concentrations of fructose than SOV-derived calves (94.5 ± 3.2 vs. 108.8 ± 2.8 mg/dL, $P=0.001$, respectively), whereas no differences were observed between IVF- and SOV-derived calves in the plasma during the first 24 h regarding the overall mean

values for D-glucose (69.1 ± 2.0 vs. 67.1 ± 1.8 mg/dL, $P=0.450$) and L-lactate concentrations (38.2 ± 2.3 vs. 37.6 ± 2.1 mg/dL, $P=0.840$), respectively. No differences were observed between groups for D-glucose, D-fructose and L-lactate concentrations at any given time point from birth to 24 h of life of newborn calves (Table 7). As expected, glucose levels fell soon after birth (first 60 min), to quickly increase up to 6 h of life, gradually returning to physiological values up to 24 h after birth (Figure 6a). Plasma fructose concentrations were twice as high as glucose at birth, and slightly increased in the first 10 min of life, likely due to the fructose bolus venous infusion. Then, fructose levels gradually fell up to 6 h of life, remaining low afterwards (Figure 6b). Lactate concentrations, in turn, were very high in the first 20 to 30 min of life, but quickly fell to normal clinical and physiological levels over time (Figure 6c).

Table 7. Plasma concentrations of D-Fructose, D-glucose and L-lactate in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life (LSM $\pm$ SEM)

Group	Time (min)*	Substrate concentrations (mg/dL)		
		D-Glucose	D-Fructose	L-Lactate
<i>In vivo</i>	-5	63.6 ± 6.8^a	143.9 ± 10.4^a	71.6 ± 7.7^a
	+5	61.2 ± 6.8^a	152.4 ± 11.6^a	50.0 ± 7.7^a
	10	56.2 ± 6.8^a	163.8 ± 11.6^a	39.4 ± 7.7^a
	20	51.2 ± 6.8^a	163.7 ± 10.4^a	34.8 ± 7.7^a
	30	47.4 ± 6.8^a	152.9 ± 10.4^a	30.2 ± 7.7^a
	45	50.0 ± 6.8^a	144.9 ± 10.4^a	27.8 ± 7.7^a
	60	51.8 ± 6.8^a	119.1 ± 10.4^a	25.0 ± 7.7^a
	90	52.0 ± 6.8^a	106.7 ± 10.4^a	31.6 ± 7.7^a
	120	65.6 ± 6.8^a	100.7 ± 10.4^a	37.8 ± 7.7^a
	180	74.0 ± 6.8^a	88.6 ± 10.4^a	37.8 ± 7.7^a
	240	81.6 ± 6.8^a	82.2 ± 10.4^a	39.0 ± 7.7^a
	360	77.6 ± 6.8^a	66.6 ± 10.4^a	35.4 ± 7.7^a
	720	85.4 ± 6.8^a	22.0 ± 11.6^a	44.4 ± 7.7^a
	1440	121.4 ± 6.8^a	15.9 ± 10.4^a	21.4 ± 7.7^a
<i>In vitro</i>	-5	65.5 ± 7.6^a	119.4 ± 11.6^a	47.5 ± 8.6^a
	+5	62.0 ± 7.6^a	132.7 ± 11.6^a	52.3 ± 8.6^a
	10	57.0 ± 7.6^a	133.1 ± 11.6^a	42.5 ± 8.6^a
	20	53.3 ± 7.6^a	141.3 ± 11.6^a	38.5 ± 8.6^a
	30	52.8 ± 7.6^a	135.5 ± 11.6^a	36.0 ± 8.6^a
	45	51.0 ± 7.6^a	128.3 ± 11.6^a	34.0 ± 8.6^a
	60	50.8 ± 7.6^a	108.4 ± 11.6^a	33.3 ± 8.6^a
	90	57.5 ± 7.6^a	98.9 ± 11.6^a	32.8 ± 8.6^a
	120	68.5 ± 7.6^a	94.8 ± 11.6^a	33.5 ± 8.6^a
	180	81.8 ± 7.6^a	82.2 ± 13.4^a	35.5 ± 8.6^a
	240	74.5 ± 7.6^a	70.5 ± 11.6^a	36.5 ± 8.6^a
	360	75.8 ± 7.6^a	54.3 ± 13.4^a	40.8 ± 8.6^a
	720	86.0 ± 7.6^a	16.3 ± 11.6^a	45.0 ± 8.6^a
	1440	131.5 ± 7.6^a	7.3 ± 11.6^a	26.8 ± 8.6^a

^{a,b}: Numbers in the same row without common superscripts differ, $P<0.05$.

* Related to the time of the bolus infusion of labeled fructose ($t=0$) in each calf, performed 10 min after birth

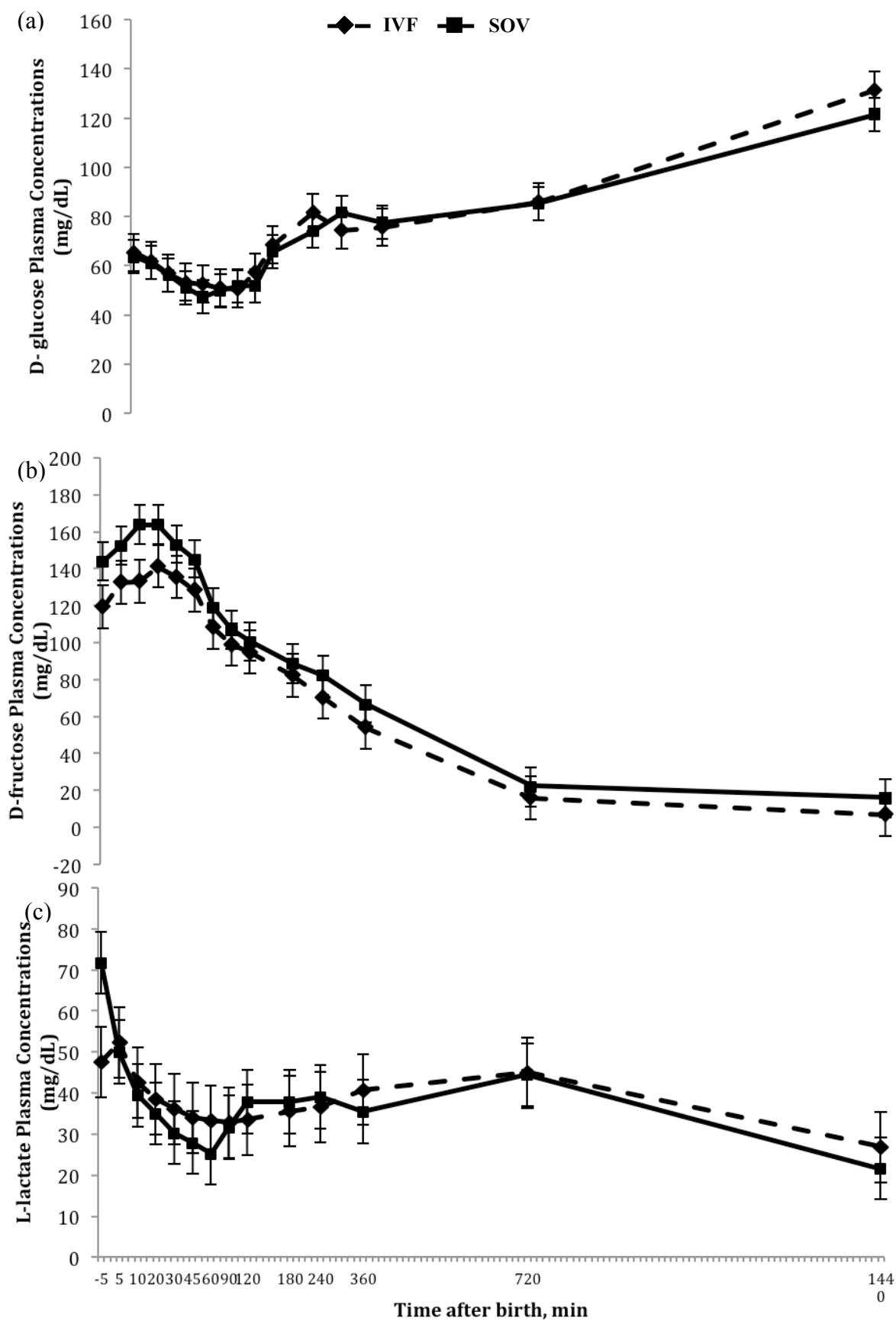


Figure 6. D-Glucose (a), D-Fructose (b), and L-Lactate (c) plasma concentrations in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life (LSM $\pm$ SEM).

Not surprisingly, fructose concentrations in plasma and in allantoic fluid were positively correlated with one another ($r=0.79$; $P=0.020$), with the existence of a trend between plasma and amnion to be positively correlated ($r=0.73$; $P=0.065$), irrespective of the group. Also, a trend for a positive correlation ($r=0.59$; $P=0.092$) existed between glucose and lactate levels in the first 24 h of life.

In IVF-derived calves, glucose plasma concentrations were positively and negatively correlated with triokinase expression levels in the liver ($r=1.00$, $P=0.008$) and with hindleg length ($r=-0.97$; $P=0.034$), respectively, which may have a metabolic significance for animals in that group, being suggestive of a fructose participation in glucose homeostasis. Moreover, such relationships indicate that plasma glucose levels may be lower in larger calves, and vice-versa. On the other hand, in SOV-derived calves, fructose concentrations in the allantoic fluid ($r=0.95$, $P=0.046$) and in the amniotic fluid ($r=0.99$, $P=0.079$) were positively correlated with liver aldolase B expression levels. Also, fructose plasma concentrations ($r=0.87$, $p=0.054$) tended to be positively correlated with LDH-A expression levels. Interestingly, pre-natal higher fructose levels in plasma and fetal fluids may modulate the intermediate metabolism after birth through the regulation of liver metabolic enzymes. In addition, glucose and lactate plasma concentrations were positively correlated with one another ($r=0.88$, $P=0.049$) in the control group.

3.3.2.2 Vital signs in newborn calves from birth to 24 h of life

As expected, body temperature drops soon after birth, returning to higher (normal) levels by 3 h of life, normalizing afterwards (Figure 7a and Table 8). No differences between IVF- and SOV-derived animals were observed for body temperature soon after birth (-5 min and +10 min), and at and after time +90 min onwards. However, body temperature was lower in *in vitro*- than in *in vivo*-derived calves from time +20 min through time +60 min, suggesting that IVF-derived calves had a slower response to thermoregulate body temperature within the first hour of life.

Heart rates (HR) and respiratory rates (RR) were similar between groups throughout the period of study, except for time -5 min, as described earlier. Nonetheless, irrespective of the group, HR and RRs were more stable during the first 3 h of life, with heart rates (HR) tending to be higher and lower during that period of adaptation to the new environment (Table 8 and Figure 7b and 7c).

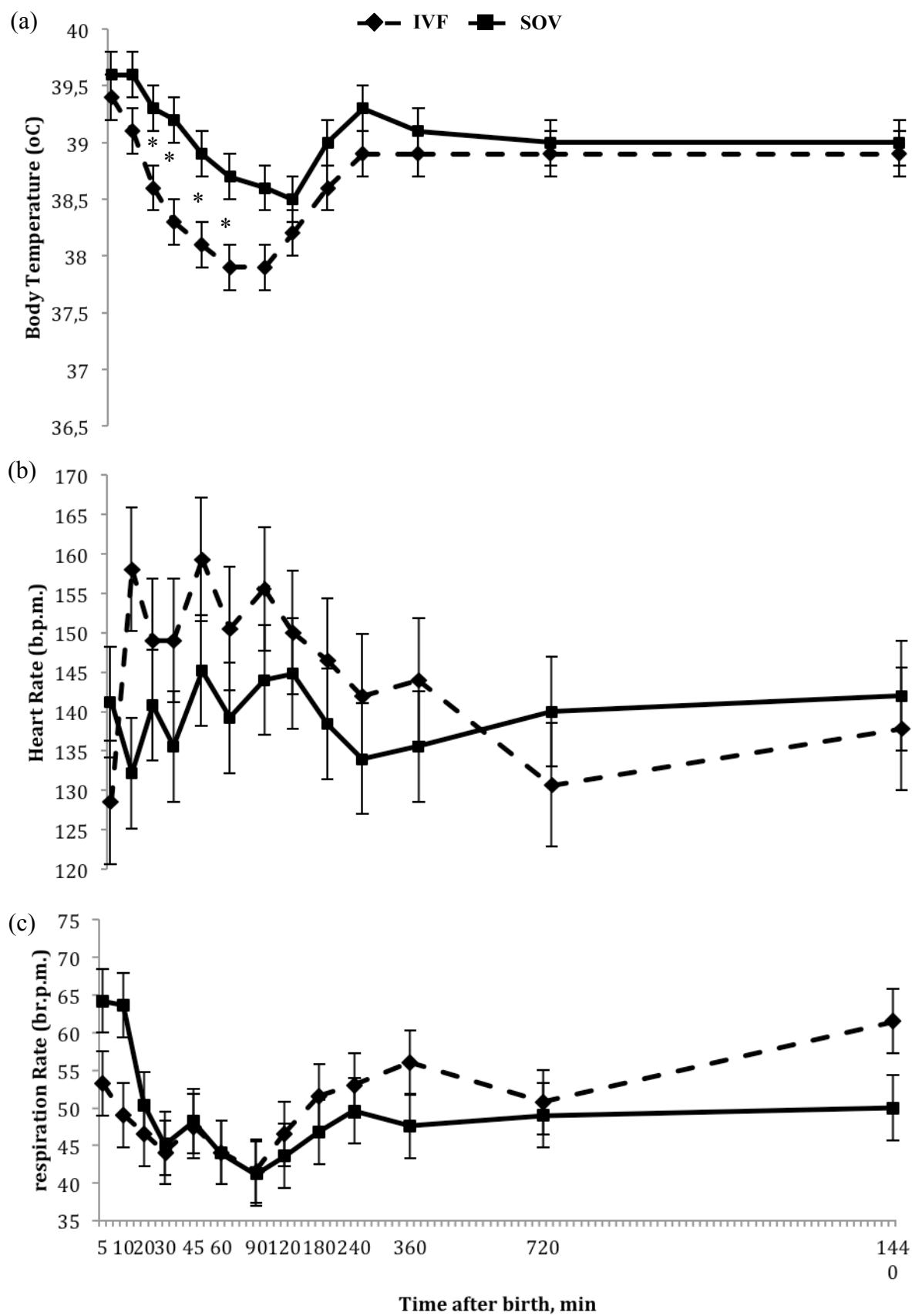


Figure 7. Body temperature (a), BT (°C), heart rate (b) HR (b.p.m.), and respiratory rate (c) RR (br.p.m.) in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life (LSM $\pm$ SEM). *P<0.05.

Table 8. Vital signs in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life (LSM $\pm$ SEM)

Group	Time* (min)	Vital Signs		
		Body Temperature (°C)	Heart rate (b.p.m.)	Respiratory rate (br.p.m.)
<i>In vivo</i>	-5	39.6°C $\pm$ 0.2 ^a	141.2 $\pm$ 7.0 ^a	64.2 $\pm$ 3.9 ^a
	10	39.6°C $\pm$ 0.2 ^a	132.2 $\pm$ 7.0 ^a	63.6 $\pm$ 3.9 ^a
	20	39.3°C $\pm$ 0.2 ^a	140.8 $\pm$ 7.0 ^a	50.4 $\pm$ 3.9 ^a
	30	39.2°C $\pm$ 0.2 ^a	135.6 $\pm$ 7.0 ^a	45.2 $\pm$ 3.9 ^a
	45	38.8°C $\pm$ 0.2 ^a	145.2 $\pm$ 7.0 ^a	48.2 $\pm$ 3.9 ^a
	60	38.7°C $\pm$ 0.2 ^a	139.2 $\pm$ 7.0 ^a	44.4 $\pm$ 3.9 ^a
	90	38.6°C $\pm$ 0.2 ^a	144.0 $\pm$ 7.0 ^a	41.2 $\pm$ 3.9 ^a
	120	38.5°C $\pm$ 0.2 ^a	144.8 $\pm$ 7.0 ^a	43.6 $\pm$ 3.9 ^a
	180	39.0°C $\pm$ 0.2 ^a	138.4 $\pm$ 7.0 ^a	46.8 $\pm$ 3.9 ^a
	240	39.3°C $\pm$ 0.2 ^a	134.0 $\pm$ 7.0 ^a	49.6 $\pm$ 3.9 ^a
	360	39.1°C $\pm$ 0.2 ^a	135.6 $\pm$ 7.0 ^a	47.6 $\pm$ 3.9 ^a
	720	39.0°C $\pm$ 0.2 ^a	140.0 $\pm$ 7.7 ^a	49.0 $\pm$ 4.3 ^a
	1440	39.0°C $\pm$ 0.3 ^a	142.0 $\pm$ 11.0 ^a	50.0 $\pm$ 6.1 ^a
<i>In vitro</i>	-5	39.5°C $\pm$ 0.2 ^a	128.5 $\pm$ 7.8 ^a	53.3 $\pm$ 4.3 ^a
	10	39.1°C $\pm$ 0.2 ^a	158.0 $\pm$ 7.8 ^a	49.0 $\pm$ 4.3 ^a
	20	38.6°C $\pm$ 0.2 ^b	149.0 $\pm$ 7.8 ^a	46.5 $\pm$ 4.3 ^a
	30	38.3°C $\pm$ 0.2 ^b	149.0 $\pm$ 7.8 ^a	44.0 $\pm$ 4.3 ^a
	45	38.1°C $\pm$ 0.2 ^b	159.3 $\pm$ 7.8 ^a	47.5 $\pm$ 4.3 ^a
	60	38.0°C $\pm$ 0.2 ^b	150.5 $\pm$ 7.8 ^a	44.0 $\pm$ 4.3 ^a
	90	37.9°C $\pm$ 0.2 ^a	155.5 $\pm$ 7.8 ^a	41.5 $\pm$ 4.3 ^a
	120	38.2°C $\pm$ 0.2 ^a	150.0 $\pm$ 7.8 ^a	46.5 $\pm$ 4.3 ^a
	180	38.6°C $\pm$ 0.2 ^a	146.5 $\pm$ 7.8 ^a	51.5 $\pm$ 4.3 ^a
	240	39.0°C $\pm$ 0.2 ^a	142.0 $\pm$ 7.8 ^a	53.0 $\pm$ 4.3 ^a
	360	38.9°C $\pm$ 0.2 ^a	144.0 $\pm$ 7.8 ^a	56.0 $\pm$ 4.3 ^a
	720	38.9°C $\pm$ 0.2 ^a	130.7 $\pm$ 8.9 ^a	50.7 $\pm$ 5.0 ^a
	1440	38.9°C $\pm$ 0.2 ^a	137.8 $\pm$ 7.8 ^a	61.5 $\pm$ 4.3 ^a

^{a,b}: Numbers in the same row without common superscripts differ, P<0.05.

* Related to the time of the bolus infusion of labeled fructose (t=0) in each calf, 10 min after birth

3.3.2.3 Blood chemistry analyses in newborn calves from birth to 24 h of life

3.3.2.3.1 Blood gases, acid base balance and electrolyte concentrations in newborn calves from birth to 24 h of life

When IVF-derived calves were compared with SOV-derived animals for blood gases, acid base parameters and electrolyte concentrations overall means during the first 24 hours of life, the first group displayed higher ($p<0.05$) values for pCO₂ (58.9 $\pm$ 1.1 vs. 55.5 $\pm$ 0.9) and Cl⁻ (106.8 $\pm$ 1.7 vs. 101.0 $\pm$ 1.5) and lower ($p<0.05$) values for pH (7.28 $\pm$ 0.01 vs. 7.34 $\pm$ 0.01), pO₂ (25.7 $\pm$ 0.7 vs. 27.7 $\pm$ 0.6), HCO₃⁻ (27.4 $\pm$ 0.3 vs. 29.6 $\pm$ 0.3), BE (-0.57 $\pm$ 0.30 vs. 2.48 $\pm$ 0.27), O₂ saturation rate (38.8 $\pm$ 1.8 vs. 47.7 $\pm$ 1.6) and Na⁺ (137.1 $\pm$ 0.4 vs. 139.1 $\pm$ 0.4) than *in vivo* control group.

In the first 60 to 120 min of life, HCO_3^- and Cl^- levels were higher and Na^+ and O_2 saturation rate were lower in *in vitro*-derived calves than in controls. Overall, IVF-derived calves also had lower pH and higher BE during the first 6 h after birth (Figure 8 and Tables 9 and 10). Irrespective of the groups, pO_2 and O_2 saturation rate were negatively correlated with aldolase B expression levels in the liver ($r=-0.72$; $P=0.029$; and $r=-0.67$; $P=0.047$), crown-rump length ($r=-0.84$; $P=0.004$; and $r=-0.83$; $p=0.006$) and time to stand ($r=-0.96$; $P<0.001$; and $r=-0.94$; $P<0.001$), respectively. Also, glucose concentrations in plasma were negatively correlated with pH ($r=-0.84$; $P=0.005$), HCO_3^- ($r=-0.74$; $P=0.022$) and BE ($r=-0.80$; $P=0.010$); and lactate concentrations in plasma tended to be negatively correlated with HCO_3^- ($r=-0.64$; $P=0.064$) and BE ($r=-0.63$; $P=0.067$). In IVF-derived calves, fructose plasma concentrations were negatively correlated with pH ($r=-0.99$; $P=0.005$); lactate plasma concentrations were negatively correlated with pO_2 ($r=-1.00$; $P<0.001$) and O_2 saturation ($r=-0.99$; $P=0.005$); and triokinase expression levels in liver were negatively correlated with BE ($r=-0.99$; $P=0.046$). In SOV-derived animals, lactate plasma concentrations were negatively correlated with pH ($r=-0.96$; $P=0.008$); fructose plasma concentrations tended to have a negative correlation with pCO_2 ($r=0.83$; $P=0.082$); and aldolase B expressions levels in liver were positively correlated with pCO_2 ($r=0.91$; $P=0.031$) and negatively correlated with pO_2 ($r=-0.93$; $P=0.021$).

The differences above indicate a trend for larger calves (in special IVF-derived calves) to have more difficulty to maintain normoxia through a less efficient hematosis, with a compensatory acid-base balance to normalize pH. Also, the aforementioned relationships suggest lower oxygen levels in the blood, elevated key substrates (in special lactate), metabolic shifts, and a trend for a change in acid-base balance towards acidity in newborn calves, particularly in the first 6 h of life.

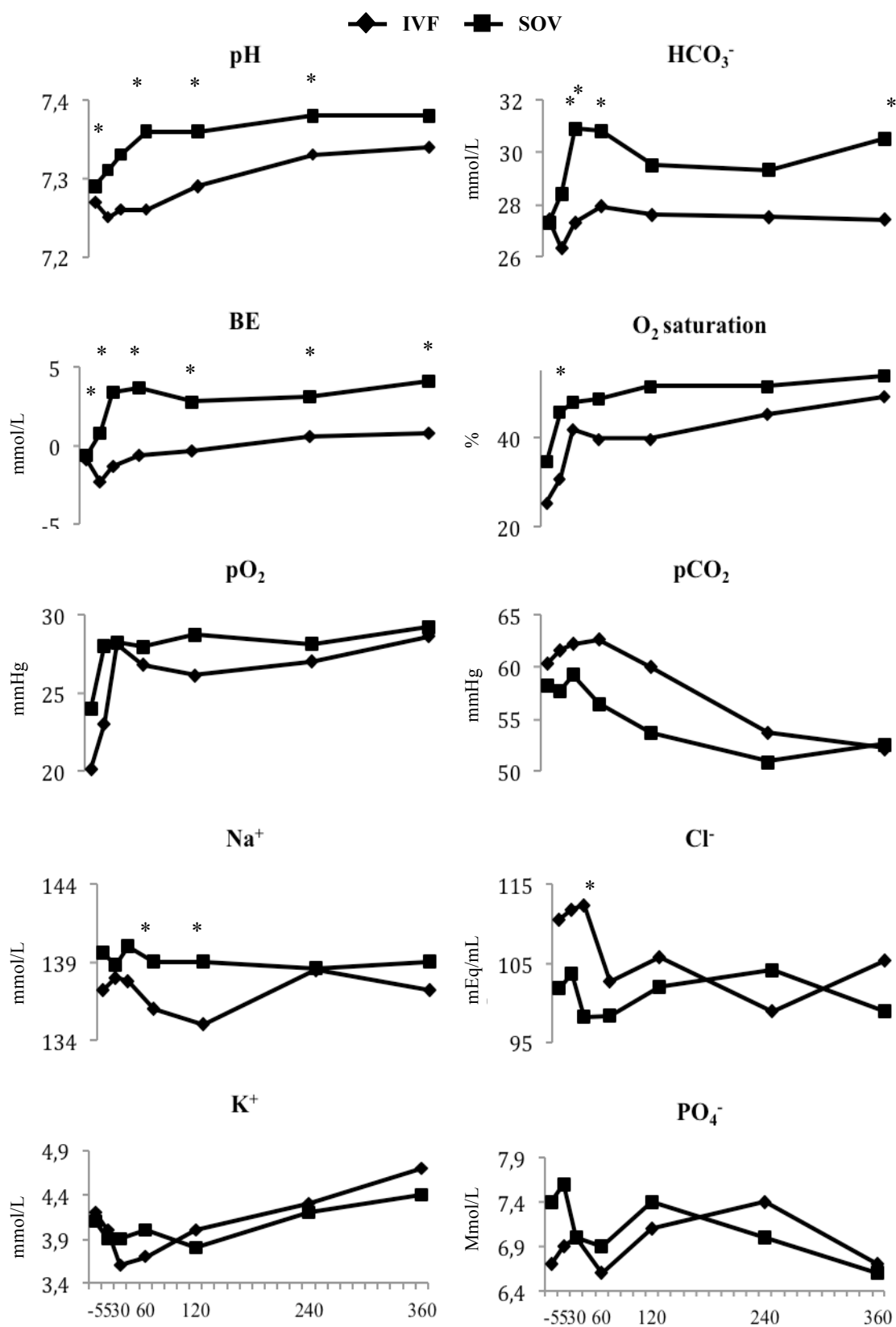


Figure 8. Mean values for blood gases, acid base parameters and electrolyte concentrations during the 6 first hours of life of newborn calves. *P<0,05.

Table 9. Concentration of blood gases and acid-base balance in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life (LSM $\pm$ SEM)

Parameters	Time (min)*	Groups	
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
pH	-5	7.30 $\pm$ 0.02 ^a	7.29 $\pm$ 0.01 ^a
	+5	7.24 $\pm$ 0.02 ^a	7.31 $\pm$ 0.01 ^b
	+30	7.26 $\pm$ 0.02 ^a	7.34 $\pm$ 0.01 ^b
	+60	7.27 $\pm$ 0.02 ^a	7.36 $\pm$ 0.01 ^b
	+120	7.29 $\pm$ 0.02 ^a	7.36 $\pm$ 0.01 ^b
	+240	7.33 $\pm$ 0.02 ^a	7.38 $\pm$ 0.01 ^b
	+360	7.34 $\pm$ 0.02 ^a	7.38 $\pm$ 0.01 ^a
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	-5	27.4 $\pm$ 0.9 ^a	27.3 $\pm$ 0.8 ^a
	+5	26.4 $\pm$ 0.9 ^a	28.4 $\pm$ 0.8 ^a
	+30	27.3 $\pm$ 0.9 ^a	30.9 $\pm$ 0.8 ^b
	+60	27.9 $\pm$ 0.9 ^a	30.8 $\pm$ 0.8 ^b
	+120	27.6 $\pm$ 0.9 ^a	29.5 $\pm$ 0.8 ^a
	+240	27.6 $\pm$ 0.9 ^a	29.3 $\pm$ 0.8 ^a
	+360	27.5 $\pm$ 0.9 ^a	30.5 $\pm$ 0.8 ^b
BE (mmol/L)	-5	-0.9 $\pm$ 0.8 ^a	-0.6 $\pm$ 0.7 ^a
	+5	-2.3 $\pm$ 0.8 ^a	0.8 $\pm$ 0.7 ^b
	+30	-1.3 $\pm$ 0.8 ^a	3.4 $\pm$ 0.7 ^b
	+60	-0.6 $\pm$ 0.8 ^a	3.7 $\pm$ 0.7 ^b
	+120	-0.3 $\pm$ 0.8 ^a	2.8 $\pm$ 0.7 ^b
	+240	0.6 $\pm$ 0.8 ^a	3.1 $\pm$ 0.7 ^b
	+360	0.8 $\pm$ 0.8 ^a	4.1 $\pm$ 0.7 ^b
O ₂ saturation (%)	-5	30.6% $\pm$ 4.7 ^a	45.7% $\pm$ 4.2 ^a
	+5	25.4% $\pm$ 4.7 ^a	34.7% $\pm$ 4.2 ^b
	+30	41.9% $\pm$ 4.7 ^a	48.0% $\pm$ 4.2 ^a
	+60	39.8% $\pm$ 4.7 ^a	48.7% $\pm$ 4.2 ^a
	+120	39.7% $\pm$ 4.7 ^a	51.5% $\pm$ 4.2 ^a
	+240	45.2% $\pm$ 4.7 ^a	51.5% $\pm$ 4.2 ^a
	+360	49.1% $\pm$ 4.7 ^a	53.8% $\pm$ 4.2 ^a
pO ₂ (mmHg)	-5	20.1 $\pm$ 1.9 ^a	24.0 $\pm$ 1.7 ^a
	+5	23.0 $\pm$ 1.9 ^a	28.0 $\pm$ 1.7 ^a
	+30	28.1 $\pm$ 1.9 ^a	28.2 $\pm$ 1.7 ^a
	+60	26.8 $\pm$ 1.9 ^a	27.9 $\pm$ 1.7 ^a
	+120	26.1 $\pm$ 1.9 ^a	28.7 $\pm$ 1.7 ^a
	+240	27.1 $\pm$ 1.9 ^a	28.1 $\pm$ 1.7 ^a
	+360	28.6 $\pm$ 1.9 ^a	29.2 $\pm$ 1.7 ^a
pCO ₂ (mmHg)	-5	60.3 $\pm$ 2.8 ^a	58.2 $\pm$ 2.5 ^a
	+5	61.6 $\pm$ 2.8 ^a	57.8 $\pm$ 2.5 ^a
	+30	62.2 $\pm$ 2.8 ^a	59.2 $\pm$ 2.5 ^a
	+60	62.7 $\pm$ 2.8 ^a	56.4 $\pm$ 2.5 ^a
	+120	60.0 $\pm$ 2.8 ^a	53.6 $\pm$ 2.5 ^a
	+240	53.6 $\pm$ 2.8 ^a	50.8 $\pm$ 2.5 ^a
	+360	52.1 $\pm$ 2.8 ^a	52.5 $\pm$ 2.5 ^a

^{a,b}: Numbers in the same row without common superscripts differ, P<0.05.

* Related to the time of the bolus infusion of labeled fructose (t=0) in each calf, 10 min after birth

Table 10. Plasma electrolyte concentrations in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life (LSM $\pm$ SEM)

Parameters	Time (min)*	Groups	
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Na ⁺ (mmol/L)	-5	137.3 $\pm$ 1.1 ^a	139.6 $\pm$ 1.0 ^a
	+5	138.0 $\pm$ 1.1 ^a	138.8 $\pm$ 1.0 ^a
	+30	137.8 $\pm$ 1.1 ^a	140 $\pm$ 1.0 ^a
	+60	136.0 $\pm$ 1.1 ^a	139.0 $\pm$ 1.0 ^b
	+120	135.0 $\pm$ 1.1 ^a	139.0 $\pm$ 1.0 ^b
	+240	138.5 $\pm$ 1.1 ^a	138.6 $\pm$ 1.0 ^a
	+360	137.3 $\pm$ 1.1 ^a	139.0 $\pm$ 1.0 ^a
Cl ⁻ (mEq/L)	-5	110.5 $\pm$ 4.5 ^a	101.9 $\pm$ 4.0 ^a
	+5	111.8 $\pm$ 4.5 ^a	103.7 $\pm$ 4.0 ^a
	+30	112.3 $\pm$ 4.5 ^a	98.2 $\pm$ 4.0 ^b
	+60	102.7 $\pm$ 4.5 ^a	98.4 $\pm$ 4.0 ^a
	+120	105.9 $\pm$ 4.5 ^a	102.0 $\pm$ 4.0 ^a
	+240	99.0 $\pm$ 4.5 ^a	104.1 $\pm$ 4.0 ^a
	+360	105.3 $\pm$ 4.5 ^a	98.9 $\pm$ 4.0 ^a
K ⁺ (mEq/L)	-5	4.2 $\pm$ 0.17 ^a	4.1 $\pm$ 0.15 ^a
	+5	4.0 $\pm$ 0.17 ^a	3.9 $\pm$ 0.15 ^a
	+30	3.6 $\pm$ 0.17 ^a	3.9 $\pm$ 0.15 ^a
	+60	3.7 $\pm$ 0.17 ^a	4.0 $\pm$ 0.15 ^a
	+120	4.0 $\pm$ 0.17 ^a	3.8 $\pm$ 0.15 ^a
	+240	4.3 $\pm$ 0.17 ^a	4.2 $\pm$ 0.15 ^a
	+360	4.7 $\pm$ 0.17 ^a	4.4 $\pm$ 0.15 ^a
Ca ²⁺ (mmol/L)	-5	2.68 $\pm$ 1.0 ^a	2.57 $\pm$ 0.9 ^a
	+5	2.58 $\pm$ 1.0 ^a	2.6 $\pm$ 0.9 ^a
	+30	2.78 $\pm$ 1.0 ^a	2.74 $\pm$ 0.9 ^a
	+60	2.50 $\pm$ 1.0 ^a	2.42 $\pm$ 0.9 ^a
	+120	2.50 $\pm$ 1.0 ^a	2.48 $\pm$ 0.9 ^a
	+240	2.78 $\pm$ 1.0 ^a	2.93 $\pm$ 0.9 ^a
	+360	2.38 $\pm$ 1.0 ^a	2.38 $\pm$ 0.9 ^a
PO ₄ (mmol/L)	-5	2.16 $\pm$ 0.6 ^a	2.39 $\pm$ 0.5 ^a
	+5	2.23 $\pm$ 0.6 ^a	2.45 $\pm$ 0.5 ^a
	+30	2.26 $\pm$ 0.6 ^a	2.26 $\pm$ 0.5 ^a
	+60	2.13 $\pm$ 0.6 ^a	2.23 $\pm$ 0.5 ^a
	+120	2.29 $\pm$ 0.6 ^a	2.39 $\pm$ 0.5 ^a
	+240	2.39 $\pm$ 0.6 ^a	2.26 $\pm$ 0.5 ^a
	+360	2.19 $\pm$ 0.6 ^a	2.13 $\pm$ 0.5 ^a

^{a,b}: Numbers in the same row without common superscripts differ, P<0.05.

* Related to the time of the bolus infusion of labeled fructose (t=0) in each calf, 10 min after birth

3.3.2.3.2 Hepatic, muscle and kidneys functions in newborn calves from birth to 24 h of life

During the first 24 h of life, IVF-derived calves were systemically similar to controls, with the measured plasma components used to indirectly assess liver, muscle and kidney functions all falling within normal physiological ranges. Nonetheless, at a few time points, *in vitro*-derived calves displayed higher mean values for albumin and creatinine,

and lower for alkaline phosphatase, total bilirubin, direct bilirubin, indirect bilirubin, ALT, AST, and GGT than SOV-derived calves (Tables 11, 12, and 14), but with no apparent clinical significance. No statistical differences were observed between IVF- and SOV-derived calves at any time point for total protein, CPK, and blood urea nitrogen (Tables 11 to 14).

Table 11. Concentrations of plasma components indicative of liver function in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life (LSM $\pm$ SEM)

Parameters	Time (min)*	Groups	
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Total protein (g/dL)	-5	4.5 $\pm$ 0.2 ^a	4.3 $\pm$ 0.1 ^a
	+5	4.3 $\pm$ 0.2 ^a	4.2 $\pm$ 0.1 ^a
	+30	4.3 $\pm$ 0.2 ^a	4.2 $\pm$ 0.1 ^a
	+60	4.3 $\pm$ 0.2 ^a	4.2 $\pm$ 0.1 ^a
	+120	4.3 $\pm$ 0.2 ^a	4.2 $\pm$ 0.1 ^a
	+240	4.2 $\pm$ 0.2 ^a	4.3 $\pm$ 0.1 ^a
	+360	4.7 $\pm$ 0.2 ^a	4.7 $\pm$ 0.1 ^a
	+1440	6.0 $\pm$ 0.2 ^a	6.0 $\pm$ 0.1 ^a
Albumin (g/dL)	-5	2.2 $\pm$ 0.1 ^a	2.2 $\pm$ 0.1 ^a
	+5	2.2 $\pm$ 0.1 ^a	2.2 $\pm$ 0.1 ^a
	+30	2.3 $\pm$ 0.1 ^a	2.2 $\pm$ 0.1 ^a
	+60	2.2 $\pm$ 0.1 ^a	2.2 $\pm$ 0.1 ^a
	+120	2.3 $\pm$ 0.1 ^a	2.2 $\pm$ 0.1 ^a
	+240	2.2 $\pm$ 0.1 ^a	2.0 $\pm$ 0.1 ^b
	+360	2.3 $\pm$ 0.1 ^a	1.7 $\pm$ 0.1 ^b
	+1440	2.1 $\pm$ 0.1 ^a	1.8 $\pm$ 0.1 ^a
Total bilirubin (mg/dL)	-5	0.5 $\pm$ 0.1 ^a	0.4 $\pm$ 0.1 ^a
	+5	0.3 $\pm$ 0.1 ^a	0.5 $\pm$ 0.1 ^b
	+30	0.4 $\pm$ 0.1 ^a	0.5 $\pm$ 0.1 ^a
	+60	0.5 $\pm$ 0.1 ^a	0.6 $\pm$ 0.1 ^a
	+120	0.5 $\pm$ 0.1 ^a	0.8 $\pm$ 0.1 ^b
	+240	0.6 $\pm$ 0.1 ^a	1.0 $\pm$ 0.1 ^a
	+360	0.5 $\pm$ 0.1 ^a	0.7 $\pm$ 0.1 ^a
	+1440	0.7 $\pm$ 0.1 ^a	0.8 $\pm$ 0.1 ^a
Direct bilirubin (mg/dL)	-5	0.3 $\pm$ 0.04 ^a	0.1 $\pm$ 0.04 ^a
	+5	0.1 $\pm$ 0.04 ^a	0.2 $\pm$ 0.04 ^a
	+30	0.2 $\pm$ 0.04 ^a	0.2 $\pm$ 0.04 ^a
	+60	0.2 $\pm$ 0.04 ^a	0.2 $\pm$ 0.04 ^a
	+120	0.2 $\pm$ 0.04 ^a	0.3 $\pm$ 0.04 ^b
	+240	0.3 $\pm$ 0.04 ^a	0.3 $\pm$ 0.04 ^a
	+360	0.2 $\pm$ 0.04 ^a	0.3 $\pm$ 0.04 ^a
	+1440	0.3 $\pm$ 0.04 ^a	0.3 $\pm$ 0.04 ^a
Indirect bilirubin (mg/dL)	-5	0.3 $\pm$ 0.09 ^a	0.2 $\pm$ 0.08 ^a
	+5	0.2 $\pm$ 0.09 ^a	0.3 $\pm$ 0.08 ^b
	+30	0.2 $\pm$ 0.09	0.3 $\pm$ 0.08
	+60	0.3 $\pm$ 0.09 ^a	0.5 $\pm$ 0.08 ^b
	+120	0.3 $\pm$ 0.09 ^a	0.5 $\pm$ 0.08 ^a
	+240	0.3 $\pm$ 0.09 ^a	0.7 $\pm$ 0.08 ^b
	+360	0.3 $\pm$ 0.09 ^a	0.5 $\pm$ 0.08 ^a
	+1440	0.4 $\pm$ 0.09 ^a	0.5 $\pm$ 0.09 ^a

^{a,b}: Numbers in the same row without common superscripts differ, $P < 0.05$.

* Related to the time of the bolus infusion of labeled fructose (t=0) in each calf, 10 min after birth

Table 12. Concentrations of hepatic enzymes in plasma indicative of liver function in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life (LSM $\pm$ SEM)

Parameters	Time (min)*	Groups	
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Alkaline phosphatase (U/L)	-5	140.0 $\pm$ 37.7 ^a	191.8 $\pm$ 33.7 ^a
	+5	193.7 $\pm$ 37.7 ^a	208.4 $\pm$ 33.7 ^a
	+30	166.0 $\pm$ 37.7 ^a	205.9 $\pm$ 33.7 ^a
	+60	213.8 $\pm$ 37.7 ^a	212.5 $\pm$ 33.7 ^a
	+120	197.4 $\pm$ 37.7 ^a	219.2 $\pm$ 33.7 ^a
	+240	169.1 $\pm$ 37.7 ^a	302.4 $\pm$ 33.7 ^b
	+360	305.7 $\pm$ 37.7 ^a	294.3 $\pm$ 33.7 ^a
	+1440	423.0 $\pm$ 37.7 ^a	447.2 $\pm$ 33.7 ^a
ALT (U/L)	-5	9.0 $\pm$ 1.7 ^a	8.3 $\pm$ 1.5 ^a
	+5	5.0 $\pm$ 1.7 ^a	8.1 $\pm$ 1.5 ^b
	+30	4.6 $\pm$ 1.7 ^a	8.8 $\pm$ 1.5 ^b
	+60	5.4 $\pm$ 1.7 ^a	9.6 $\pm$ 1.5 ^b
	+120	6.4 $\pm$ 1.7 ^a	10.8 $\pm$ 1.5 ^b
	+240	6.7 $\pm$ 1.7 ^a	19.9 $\pm$ 1.5 ^b
	+360	12.0 $\pm$ 1.7 ^a	22.7 $\pm$ 1.5 ^b
	+1440	20.0 $\pm$ 1.7 ^a	25.7 $\pm$ 1.7 ^a
AST (U/L)	-5	14.3 $\pm$ 6.7 ^a	21.5 $\pm$ 6.0 ^a
	+5	15.5 $\pm$ 6.7 ^a	25.0 $\pm$ 6.0 ^a
	+30	15.9 $\pm$ 6.7 ^a	25.2 $\pm$ 6.0 ^a
	+60	14.1 $\pm$ 6.7 ^a	33.9 $\pm$ 6.0 ^b
	+120	20.9 $\pm$ 6.7 ^a	42.4 $\pm$ 6.0 ^b
	+240	35.5 $\pm$ 6.7 ^a	62.9 $\pm$ 6.0 ^b
	+360	48.9 $\pm$ 6.7 ^a	78.4 $\pm$ 6.0 ^b
	+1440	95.2 $\pm$ 6.7 ^a	112.1 $\pm$ 6.7 ^a
GGT (U/L)	-5	9.1 $\pm$ 199.9 ^a	11.8 $\pm$ 178.8 ^a
	+5	10.9 $\pm$ 199.9 ^a	11.2 $\pm$ 178.8 ^a
	+30	10.6 $\pm$ 199.9 ^a	13.1 $\pm$ 178.8 ^a
	+60	11.7 $\pm$ 230.8 ^a	11.9 $\pm$ 178.8 ^a
	+120	26.6 $\pm$ 199.9 ^a	51.2 $\pm$ 178.8 ^b
	+240	177.2 $\pm$ 199.9 ^a	597.0 $\pm$ 178.8 ^a
	+360	807.5 $\pm$ 199.9 ^a	1188.5 $\pm$ 178.8 ^a
	+1440	1759.7 $\pm$ 199.9 ^a	1604.3 $\pm$ 199.9 ^a

^{a,b}: Numbers in the same row without common superscripts differ, $P < 0.05$.

* Related to the time of the bolus infusion of labeled fructose (t=0) in each calf, 10 min after birth

Table 13. Concentrations of creatinine phosphokinase (CPK) in plasma indicative of muscle function in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life (LSM $\pm$ SEM)

Parameter	Time (min)*	Groups	
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
CPK (U/L)	-5	37.5 $\pm$ 317.4 ^a	136.7 $\pm$ 283.9 ^a
	+5	56.3 $\pm$ 317.4 ^a	276.9 $\pm$ 283.9 ^a
	+30	59.5 $\pm$ 317.4 ^a	348.8 $\pm$ 283.9 ^a
	+60	64.8 $\pm$ 317.4 ^a	544.8 $\pm$ 283.9 ^a
	+120	135.2 $\pm$ 317.4 ^a	820.4 $\pm$ 283.9 ^a
	+240	399.9 $\pm$ 317.4 ^a	1256.9 $\pm$ 283.9 ^a
	+360	584.7 $\pm$ 317.4 ^a	1528.1 $\pm$ 283.9 ^a
	+1440	259.4 $\pm$ 317.4 ^a	409.0 $\pm$ 317.4 ^a

^{a,b}: Numbers in the same row without common superscripts differ, $P < 0.05$.

* Related to the time of the bolus infusion of labeled fructose (t=0) in each calf, 10 min after birth

Table 14. Concentrations of plasma components indicative of kidney function in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life (LSM $\pm$ SEM)

Parameters	Time (min)*	Groups	
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Blood urea nitrogen (mg/dL)	-5	36.8 $\pm$ 5.9 ^a	36.6 $\pm$ 5.0 ^a
	+5	37.1 $\pm$ 5.9 ^a	35.6 $\pm$ 5.0 ^a
	+30	35.1 $\pm$ 5.9 ^a	36.3 $\pm$ 5.0 ^a
	+60	35.1 $\pm$ 5.9 ^a	35.6 $\pm$ 5.0 ^a
	+120	32.9 $\pm$ 5.9 ^a	35.0 $\pm$ 5.0 ^a
	+240	31.9 $\pm$ 5.9 ^a	33.8 $\pm$ 5.0 ^a
	+360	42.6 $\pm$ 5.9 ^a	33.8 $\pm$ 5.0 ^a
	+1440	20.9 $\pm$ 5.6 ^a	19.0 $\pm$ 5.6 ^a
Creatinine (mg/dL)	-5	2.7 $\pm$ 0.2 ^a	2.4 $\pm$ 0.2 ^a
	+5	2.7 $\pm$ 0.2 ^a	2.4 $\pm$ 0.2 ^a
	+30	2.5 $\pm$ 0.2 ^a	2.3 $\pm$ 0.2 ^a
	+60	2.7 $\pm$ 0.2 ^a	2.2 $\pm$ 0.2 ^a
	+120	2.5 $\pm$ 0.2 ^a	2.2 $\pm$ 0.2 ^a
	+240	1.9 $\pm$ 0.2 ^a	2.0 $\pm$ 0.2 ^a
	+360	2.3 $\pm$ 0.2 ^a	1.7 $\pm$ 0.2 ^b
	+1440	1.4 $\pm$ 0.2 ^a	1.4 $\pm$ 0.2 ^a

^{a,b}: Numbers in the same row without common superscripts differ, $P < 0.05$.

* Related to the time of the bolus infusion of labeled fructose ($t=0$) in each calf, 10 min after birth

3.3.2.3.3 Hematologic parameters in newborn calves from birth to 24 h of life

Not surprisingly, RBC counts and PCV slightly fell during the first 24 h of life, irrespective of the group (Table 15), with no statistical differences observed between groups at any point time for RBC, PCV, and Hb (Table 15). However, lower MCV at time +240 min, and higher MCH at +60 min, MCHC at times -5 min, +5min, +60min, +120min, and +240min, and RDW for most time points were detected in *in vitro*-derived calves when compared with control counterparts (Table 16).

Irrespective of the group, MCHC was negatively correlated with respiratory rate ($r=-0.75$; $P=0.019$) in newborn calves. In *in vitro*-derived calves, both RDW and MCH were negatively correlated with O₂ saturation ($r=-0.96$, $P=0.036$; $r=-0.99$, $P=0.006$, respectively) and with pO₂ ($r=-0.98$, $P=0.019$; $r=-0.99$, $P=0.003$, respectively). In this same group of animals, RDW and MCH were also positively correlated with lactate plasma concentrations ($r=0.98$, $P=0.018$; $r=0.99$, $P=0.004$, respectively).

Table 15. Erythrogram values in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life (LSM $\pm$ SEM)

Parameters	Time (min*)	Groups	
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	-5	5.8 ± 0.5^a	5.9 ± 0.4^a
	+5	5.9 ± 0.5^a	6.1 ± 0.4^a
	+30	6.0 ± 0.5^a	6.3 ± 0.4^a
	+60	5.9 ± 0.4^a	6.5 ± 0.4^a
	+120	5.7 ± 0.4^a	5.4 ± 0.4^a
	+240	5.5 ± 0.4^a	5.6 ± 0.4^a
	+360	5.3 ± 0.4^a	5.2 ± 0.4^a
	+1440	4.9 ± 0.4^a	5.4 ± 0.4^a
PCV (%)	-5	24.2 ± 2.5^a	28.6 ± 1.9^a
	+5	24.8 ± 2.1^a	27.1 ± 1.9^a
	+30	25.5 ± 2.5^a	27.7 ± 1.9^a
	+60	24.6 ± 2.1^a	28.0 ± 1.9^a
	+120	24.2 ± 2.1^a	26.4 ± 1.9^a
	+240	22.7 ± 2.1^a	24.6 ± 1.9^a
	+360	21.8 ± 2.1^a	22.6 ± 1.9^a
	+1440	19.8 ± 2.1^a	22.8 ± 2.1^a
Hb (g/dL)	-5	9.7 ± 0.8^a	10.1 ± 0.6^a
	+5	9.7 ± 0.7^a	9.7 ± 0.6^a
	+30	9.7 ± 0.8^a	9.8 ± 0.6^a
	+60	9.6 ± 0.7^a	10.0 ± 0.6^a
	+120	9.6 ± 0.7^a	9.6 ± 0.6^a
	+240	9.0 ± 0.7^a	8.8 ± 0.6^a
	+360	8.7 ± 0.7^a	8.4 ± 0.6^a
	+1440	8.4 ± 0.7^a	8.8 ± 0.7^a

^{a,b}: Numbers in the same row without common superscripts differ, $P < 0.05$.

* Related to the time of the bolus infusion of labeled fructose ($t=0$) in each calf, 10 min after birth

When the population of white blood cells was analyzed over time, it became evident that *in vitro*-derived calves had higher values for monocytes and eosinophils at birth (-5 min) than *in vivo*-derived calves, but no statistical differences were observed between groups at any point time for any other cell type (leukocytes, lymphocytes, segmented neutrophils and banded neutrophils) during the first 24 h of life (Table 17). However, and surprisingly, platelet counts were significantly higher in *in vitro*-derived calves than in *in vivo*-derived controls in all time points throughout the first 24 h after birth (Table 18).

Table 16. Red blood cell parameters in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life (LSM $\pm$ SEM)

Parameters	Time (min*)	Groups	
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
MCV (fl)	-5	41.5 $\pm$ 2.9 ^a	39.4 $\pm$ 2.3 ^a
	+5	42.1 $\pm$ 2.5 ^a	44.1 $\pm$ 2.3 ^a
	+30	42.5 $\pm$ 2.9 ^a	44.1 $\pm$ 2.3 ^a
	+60	42.0 $\pm$ 2.5 ^a	43.6 $\pm$ 2.3 ^a
	+120	41.9 $\pm$ 2.5 ^a	43.8 $\pm$ 2.3 ^a
	+240	41.5 $\pm$ 2.5 ^a	43.5 $\pm$ 2.3 ^b
	+360	41.3 $\pm$ 2.5 ^a	43.1 $\pm$ 2.3 ^a
	+1440	33.9 $\pm$ 2.5 ^a	36.2 $\pm$ 2.5 ^a
MCH (pg)	-5	16.7 $\pm$ 1.2 ^a	18.1 $\pm$ 1.0 ^a
	+5	16.5 $\pm$ 1.1 ^a	15.8 $\pm$ 1.0 ^a
	+30	16.3 $\pm$ 1.2 ^a	15.6 $\pm$ 1.0 ^a
	+60	16.4 $\pm$ 1.1 ^a	15.4 $\pm$ 1.0 ^b
	+120	16.7 $\pm$ 1.1 ^a	18.8 $\pm$ 1.0 ^a
	+240	16.5 $\pm$ 1.1 ^a	15.8 $\pm$ 1.0 ^a
	+360	16.6 $\pm$ 1.1 ^a	16.0 $\pm$ 1.0 ^a
	+1440	17.0 $\pm$ 1.1 ^a	16.4 $\pm$ 1.1 ^a
MCHC (%)	-5	40.3 $\pm$ 1.4 ^a	35.7 $\pm$ 1.1 ^b
	+5	39.3 $\pm$ 1.2 ^a	35.9 $\pm$ 1.1 ^b
	+30	38.5 $\pm$ 1.4 ^a	35.5 $\pm$ 1.1 ^a
	+60	39.2 $\pm$ 1.2 ^a	35.8 $\pm$ 1.1 ^b
	+120	39.8 $\pm$ 1.2 ^a	36.5 $\pm$ 1.1 ^b
	+240	39.8 $\pm$ 1.2 ^a	36.0 $\pm$ 1.1 ^b
	+360	40.3 $\pm$ 1.2 ^a	37.3 $\pm$ 1.1 ^a
	+1440	42.3 $\pm$ 1.2 ^a	39.0 $\pm$ 1.2 ^a
RDW (%)	-5	24.5 $\pm$ 1.9 ^a	23.2 $\pm$ 1.5 ^b
	+5	24.4 $\pm$ 1.7 ^a	22.8 $\pm$ 1.5 ^b
	+30	29.9 $\pm$ 1.9 ^a	22.3 $\pm$ 1.5 ^b
	+60	24.4 $\pm$ 1.7 ^a	22.8 $\pm$ 1.5 ^b
	+120	28.1 $\pm$ 1.7 ^a	22.6 $\pm$ 1.5 ^b
	+240	23.6 $\pm$ 1.7 ^a	22.7 $\pm$ 1.5 ^b
	+360	23.8 $\pm$ 1.7 ^a	22.3 $\pm$ 1.5 ^b
	+1440	33.8 $\pm$ 1.7 ^a	22.4 $\pm$ 1.7 ^b

^{a,b}: Numbers in the same row without common superscripts differ, P<0.05.

* Related to the time of the bolus infusion of labeled fructose (t=0) in each calf, 10 min after birth

Table 17. White blood cell counts in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life (LSM $\pm$ SEM)

Parameters	Time (min)*	Groups	
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Leukocytes (/μL)	-5	31267 $\pm$ 4975.4 ^a	20120 $\pm$ 3853.9 ^a
	+5	24800 $\pm$ 4308.8 ^a	19400 $\pm$ 3853.9 ^a
	+30	21200 $\pm$ 4975.4 ^a	20300 $\pm$ 3853.9 ^a
	+60	24050 $\pm$ 4308.8 ^a	15200 $\pm$ 3853.9 ^a
	+120	23350 $\pm$ 4308.8 ^a	18500 $\pm$ 3853.9 ^a
	+240	15825 $\pm$ 4308.8 ^a	16120 $\pm$ 3853.9 ^a
	+360	15800 $\pm$ 4308.8 ^a	12980 $\pm$ 3853.9 ^a
	+1440	13500 $\pm$ 4308.8 ^a	13850 $\pm$ 4308.8 ^a
Lymphocytes (/μL)	-5	7160 $\pm$ 1058.0 ^a	6361.6 $\pm$ 819.5 ^a
	+5	4979.8 $\pm$ 916.2 ^a	6162.8 $\pm$ 819.5 ^a
	+30	5587.0 $\pm$ 1058.0 ^a	6817.2 $\pm$ 819.5 ^a
	+60	5365.0 $\pm$ 916.2 ^a	4816.0 $\pm$ 819.5 ^a
	+120	6379.8 $\pm$ 916.2 ^a	5088.8 $\pm$ 819.5 ^a
	+240	4837.5 $\pm$ 916.2 ^a	5524.8 $\pm$ 819.5 ^a
	+360	3836.5 $\pm$ 916.2 ^a	4088.0 $\pm$ 819.5 ^a
	+1440	3458.25 $\pm$ 916.2 ^a	3120.5 $\pm$ 916.2 ^a
Monocytes (/μL)	-5	2096.3 $\pm$ 380.1 ^a	952.8 $\pm$ 294.4 ^b
	+5	1840.3 $\pm$ 329.2 ^a	1070.8 $\pm$ 294.4 ^a
	+30	1223.0 $\pm$ 380.1 ^a	1181.6 $\pm$ 294.4 ^a
	+60	1638.3 $\pm$ 329.2 ^a	757.4 $\pm$ 294.4 ^a
	+120	1280.8 $\pm$ 329.2 ^a	1040.0 $\pm$ 294.4 ^a
	+240	710.5 $\pm$ 329.2 ^a	821.4 $\pm$ 294.4 ^a
	+360	769.0 $\pm$ 329.2 ^a	585.4 $\pm$ 294.4 ^a
	+1440	391.8 $\pm$ 329.2 ^a	640.8 $\pm$ 329.2 ^a
Eosinophils (/μL)	-5	770.7 $\pm$ 169.9 ^a	101.6 $\pm$ 131.6 ^b
	+5	338.3 $\pm$ 147.1 ^a	36.8 $\pm$ 131.6 ^a
	+30	212.0 $\pm$ 169.9 ^a	90.8 $\pm$ 131.6 ^a
	+60	435.8 $\pm$ 147.1 ^a	118.4 $\pm$ 131.6 ^a
	+120	397.0 $\pm$ 147.1 ^a	102.6 $\pm$ 131.6 ^a
	+240	215.3 $\pm$ 147.1 ^a	143.8 $\pm$ 131.6 ^a
	+360	126.0 $\pm$ 147.1 ^a	209.8 $\pm$ 131.6 ^a
	+1440	134.0 $\pm$ 147.1 ^a	86.8 $\pm$ 147.1 ^a
Banded neutrophils (/μL)	-5	1580.7 $\pm$ 277.3 ^a	552.2 $\pm$ 214.8 ^a
	+5	755.5 $\pm$ 240.1 ^a	453.4 $\pm$ 214.8 ^a
	+30	860.7 $\pm$ 277.3 ^a	416.8 $\pm$ 214.8 ^a
	+60	814.3 $\pm$ 240.1 ^a	392.8 $\pm$ 214.8 ^a
	+120	712.5 $\pm$ 240.1 ^a	470.8 $\pm$ 214.8 ^a
	+240	776.8 $\pm$ 240.1 ^a	490.2 $\pm$ 214.8 ^a
	+360	427.5 $\pm$ 240.1 ^a	571.2 $\pm$ 214.8 ^a
	+1440	642.3 $\pm$ 240.1 ^a	727.0 $\pm$ 240.1 ^a
Segmented neutrophils (/μL)	-5	19659.0 $\pm$ 3785.8 ^a	12152 $\pm$ 2932.4 ^a
	+5	16886 $\pm$ 3278.6 ^a	11676 $\pm$ 2932.4 ^a
	+30	13317 $\pm$ 3785.8 ^a	11794 $\pm$ 2932.4 ^a
	+60	15797 $\pm$ 3278.6 ^a	9115.4 $\pm$ 2932.4 ^a
	+120	14580 $\pm$ 3278.6 ^a	11798.0 $\pm$ 2932.4 ^a
	+240	9285.0 $\pm$ 3278.6 ^a	9139.8 $\pm$ 2932.4 ^a
	+360	10641.0 $\pm$ 3278.6 ^a	7525.6 $\pm$ 2932.4 ^a
	+1440	8873.8 $\pm$ 3278.6 ^a	9275.0 $\pm$ 3278.6 ^a

^{a,b}: Numbers in the same row without common superscripts differ, P<0.05.

* Related to the time of the bolus infusion of labeled fructose (t=0) in each calf, 10 min after birth

Table 18. Platelet counts in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life (LSM $\pm$ SEM)

Parameters	Time (min)*	Groups	
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Platelets ($10^3/\mu\text{L}$)	-5	681.3 $\pm$ 65.4 ^a	485.4 $\pm$ 50.7 ^b
	+5	652.5 $\pm$ 56.7 ^a	458.4 $\pm$ 50.7 ^b
	+30	707.3 $\pm$ 65.4 ^a	481.8 $\pm$ 50.7 ^b
	+60	700.5 $\pm$ 56.7 ^a	460.0 $\pm$ 50.7 ^b
	+120	673.0 $\pm$ 56.7 ^a	450.0 $\pm$ 50.7 ^b
	+240	642.3 $\pm$ 56.7 ^a	421.0 $\pm$ 50.7 ^b
	+360	619.8 $\pm$ 56.7 ^a	414.8 $\pm$ 50.7 ^b
	+1440	659.5 $\pm$ 56.7 ^a	413.3 $\pm$ 56.7 ^b

^{a,b}: Numbers in the same row without common superscripts differ, $P < 0.05$.

* Related to the time of the bolus infusion of labeled fructose ($t=0$) in each calf, 10 min after birth

3.3.2.3.4 Lipid metabolism in newborn calves from birth to 24 h of life

During the first 24 h of life, *in vitro*-derived calves had higher plasma levels of components of the lipid metabolism at time points markedly after 6 h of life onwards (Table 19), as observed for triglycerides (+360 min and +24), total cholesterol (+360 min, +24 h), and HDL +240 min, +360 min, +24 h). However, no statistical differences were observed between IVF- and SOV-derived calves at any time point for LDL and VLDL plasma concentrations (Table 19). Higher levels of such components of the fat metabolism may indicate a proper colostrums feeding and absorption. Irrespective of groups, plasma concentrations of glucose and triglycerides were positively correlated ($r=0.81$; $P=0.008$). In IVF-derived animals, fructose concentrations in amnion were positively correlated with triglycerides ($r=0.99$; $P=0.003$) and VLDL in plasma ($r=0.99$; $P=0.003$).

Table 19. Plasma concentrations of components of the lipid metabolism in IVF- and SOV-derived newborn calves from birth to 24 h of life (LSM $\pm$ SEM)

Parameters	Time (min)*	Groups	
		<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Tryglicerides (mg/dL)	-5	3.3 $\pm$ 2.0 ^a	2.8 $\pm$ 1.8 ^a
	+5	5.0 $\pm$ 2.0 ^a	4.2 $\pm$ 1.8 ^a
	+30	15.8 $\pm$ 2.0 ^a	11.0 $\pm$ 1.8 ^a
	+120	21.8 $\pm$ 2.0 ^a	19.6 $\pm$ 1.8 ^a
	+240	13.0 $\pm$ 2.0 ^a	10.0 $\pm$ 1.8 ^a
	+360	14.5 $\pm$ 2.0 ^a	9.6 $\pm$ 1.8 ^b
	+1440	16.8 $\pm$ 2.0 ^a	11.6 $\pm$ 1.8 ^b
Total Cholesterol (mg/dL)	-5	33.5 $\pm$ 2.2 ^a	27.6 $\pm$ 2.0 ^a
	+5	30.8 $\pm$ 2.2 ^a	27.2 $\pm$ 2.0 ^a
	+30	31.5 $\pm$ 2.2 ^a	26.8 $\pm$ 2.0 ^a
	+120	34.8 $\pm$ 2.2 ^a	30.4 $\pm$ 2.0 ^a
	+240	34.0 $\pm$ 2.2 ^a	29.4 $\pm$ 2.0 ^a
	+360	34.5 $\pm$ 2.2 ^a	28.2 $\pm$ 2.0 ^b
	+1440	39.3 $\pm$ 2.2 ^a	30.8 $\pm$ 2.0 ^b
HDL (mg/dL)	-5	14.0 $\pm$ 1.3 ^a	10.8 $\pm$ 1.2 ^b
	+5	10.3 $\pm$ 1.3 ^a	10.8 $\pm$ 1.2 ^a
	+30	13.8 $\pm$ 1.3 ^a	11.6 $\pm$ 1.2 ^a
	+120	14.5 $\pm$ 1.3 ^a	11.6 $\pm$ 1.2 ^a
	+240	13.8 $\pm$ 1.3 ^a	10.8 $\pm$ 1.2 ^b
	+360	14.0 $\pm$ 1.3 ^a	10.8 $\pm$ 1.2 ^b
	+1440	18.3 $\pm$ 1.3 ^a	12.6 $\pm$ 1.2 ^b
LDL (mg/dL)	-5	19.3 $\pm$ 1.8 ^a	16.4 $\pm$ 1.7 ^a
	+5	19.5 $\pm$ 1.8 ^a	15.8 $\pm$ 1.7 ^a
	+30	14.5 $\pm$ 1.8 ^a	13.2 $\pm$ 1.7 ^a
	+120	15.8 $\pm$ 1.8 ^a	14.8 $\pm$ 1.7 ^a
	+240	17.8 $\pm$ 1.8 ^a	16.4 $\pm$ 1.7 ^a
	+360	17.5 $\pm$ 1.8 ^a	15.4 $\pm$ 1.7 ^a
	+1440	17.8 $\pm$ 1.8 ^a	16.0 $\pm$ 1.7 ^a
VLDL (mg/dL)	-5	0.7 $\pm$ 0.4 ^a	0.6 $\pm$ 0.4 ^a
	+5	1.0 $\pm$ 0.4 ^a	0.8 $\pm$ 0.4 ^a
	+30	3.2 $\pm$ 0.4 ^a	2.2 $\pm$ 0.4 ^a
	+120	4.4 $\pm$ 0.4 ^a	4.0 $\pm$ 0.4 ^a
	+240	2.6 $\pm$ 0.4 ^a	2.0 $\pm$ 0.4 ^a
	+360	2.9 $\pm$ 0.4 ^a	1.9 $\pm$ 0.4 ^a
	+1440	3.4 $\pm$ 0.4 ^a	2.3 $\pm$ 0.4 ^a

^{a,b}: Numbers in the same row without common superscripts differ, P<0.05.

* Related to the time of the bolus infusion of labeled fructose (t=0) in each calf, 10 min after birth

3.4 Discussion

Among physiological deviations observed in the postnatal period after *in vitro* embryo manipulations, plasma fructose levels have been shown to be higher in some *in vitro*-produced calves in comparison with *in vivo*-produced controls during the immediate neonatal period (BERTOLINI et al., 2004; BATCHELDER et al., 2007), what may bring significant consequences to the survival of newborn calves during the hebdomadal period. Bertolini et al. (2004) observed that plasmatic concentrations of fructose and lactate paralleled one another, which may indicate a biochemical relationship between these substrates. Since fructose metabolic pathway can contribute to glucose and lactate production by the action of the fructokinase enzyme, bypassing regulatory steps of the glycolytic pathway (MAYES, 1993; BENDER 2009a; DIGGLE et al., 2009), it is likely that, under normoxic conditions, fructose can contribute to increase glycemia during the first hours of life of calves. On the other hand, it has been suggested that, in cases of systemic hypoxia caused by neonatal respiratory disorder, neonatal hyperfructosemia can bring deep metabolic consequences such as lactic acidosis, resulting in difficulties for newborn calves in adapting to life *ex utero*. Results from this study were in agreement with the studies above, at least in part, as the high expression levels of the enzymes fructokinase, aldolase B, triokinase, GAPDH and LDH-A detected in the liver of newborn calves around the first hour of life indicate that the fructose metabolic pathway may be active in these animals at birth. In addition, it is interesting to notice that glucose and lactate plasma concentrations increased, whereas fructose plasma concentrations, in parallel, decreased during the first 12 h of life of newborn calves. Furthermore, glucose and lactate correlated positively with one another in SOV-derived calves and tended to correlate positively in all newborn calves during the first 24 h of life. Taken together, these data suggest that fructose in fact not only is metabolized, but also contributes to glucose and lactate production in newborn calves.

Contrary to what was expected, fructose findings were not different between SOV- and in IVF-derived calves during the first 24 h of life, as no differences were detected either for neonatal fructosemia at all observed time points during the first 24 h of life or for gene expression patterns for liver enzymes between groups. The explanation for this may rely on the evolution of *in vitro* embryos production systems. Different from other studies, in which there were attempts to mimic abnormal phenotypes by modulating the *in vitro* culture conditions (BERTOLINI et al., 2002ab, BERTOLINI et al., 2004,

BERTOLINI et al., 2006), in this study no supportive somatic cells were used in the *in vitro* culture system and only 5% of estrous mare serum was supplemented to the IVC medium, as opposed as the usual 10% fetal calf serum used in previous related experiments. Since the use of serum and supportive cells in *in vitro* embryo culture has been associated with several problems known as the “Large Offspring Syndrome” (BEHBOODI et al., 1995; FARIN and FARIN, 1995; HASLER et al., 1995; MASSIP et al., 1996; SCHMIDT et al., 1996; KRUIP and DEN DAAS, 1997; JACOBSEN et al., 2000; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al. 2000; BERTOLINI et al., 2004), it is expected, after all, that some developmental problems may be reduced with the use of improved IVC systems, as used in the present study. This is in agreement with Gerger (2010), who used similar IVC conditions to the present work, finding no differences between IVF- and SOV-derived concepti for length and height of placentomes at 51 days of gestation, and for physical traits in fetal membranes and fetuses at 225 days of gestation. In fact, the IVF system employed by Bertolini et al. (2004), different from the one used in the present study, was described by the authors as a known system to induce the manifestation of symptoms of the large offspring syndrome during the course of pregnancy at a relatively high frequency.

In addition to the IVC system, some other factors should be mentioned as possible causal factors for variations in neonatal fructosemia, as observed in this experiment. Little data has been published about the Flemish cattle breed; hence there is no information about the reference values for neonatal fructosemia in such animals. However, as far as it has been observed in the herd at the experimental station in Lages, newborn Flemish calves are heavy, usually having higher birth weights than Holstein calves. Furthermore, increased gestation length (7 to 10 days) has been related to the birth of heavier IVF-derived calves (KRUIP and DEN DAAS, 1997; BERTOLINI et al., 2002a), which was associated with higher fructosemia immediately after birth (BERTOLINI et al., 2004). Since all calves in this experiment were delivered in the same gestation period following a parturition induction protocol, it is possible that some IVF-derived calves were born well before the naturally expected date, which may have contributed to the neonatal fructosemia levels observed in this study.

Nevertheless, some developmental abnormalities were still detected in concepti derived from IVC systems with no serum (CROSIER et al., 2001; MILES et al., 2005). In the present experiment, except for some increased physical traits, such as body weight, and lower respiratory rate, no other significant physiological differences were observed at birth

(5 min of life), including energy substrates, vital and clinical signs, blood chemistry, hematologic parameters, and acid-base balance between IVF and control calves, suggesting an apparent normalcy in these animals soon after birth. However, the period from birth up to 24 h of life revealed a trend for a difficulty to adapt to the extrauterine environment in larger and in IVF-derived calves. During the first 24 h after birth, metabolic and clinical differences were observed in vital signs and blood parameters, including the acid-base balance, gases, electrolytes and lipid metabolism in IVF-derived calves, corroborating with findings by Schmidt et al. (1996), and by Behboodi et al. (1995), Garry et al. (1996), and Bertolini et al. (2004), in a higher propensity to respiratory distress, a slower response to thermoregulate body temperature, and a defect in the regulation of energy metabolism were demonstrated in *in vitro*-derived newborn calves. Our findings in this study support the concept that such abnormalities were inter-related with one another, and were more likely to occur in IVF-derived calves than in controls.

In general, animals with increased body weight and body size have slower reflexes and may take longer to mature the reflex pathways and to acquire motor coordination after birth (BATCHELDER et al., 2007). In our trial, newborn calves with higher birth weight and longer crown-rump lengths did take longer to stand, and time to standing was correlated with time to release meconium in IVF-derived calves, demonstrating the trend described above. If unassisted, such calves may delay colostrum intake, reducing the uptake of immunoglobulins (Garry et al., 1996). This is of great significance, since increased susceptibility to infection has been reported as one of the common causes of neonatal death in newborn calves derived from IVP systems (GARRY et al., 1996; SCHMIDT et al., 1996). One of the IVF-derived calves in this study showed an enlarged umbilical cord at birth, which may indicate of aberrant placental morphology and function, also being usually associated with a higher propensity to infections and risk of death (BATCHELDER et al., 2007; MIGLINO et al., 2007). Interestingly, such calf was the second heaviest animal and had the second highest plasma fructose concentrations immediately after birth, which could be indicative of aberrant placental morphology and metabolism (BERTOLINI et al., 2004). Unfortunately, the related fetal membranes were retained and could not be analyzed.

Since IVF-derived calves had lower respiratory rate along with lower O₂ saturation rate at five minutes of life than calves from the control group, lower values for pO₂ and higher values for pCO₂ would be expected for those animals. *Au contraire*, when analyzed at each isolated point in time, neither of those two parameters differed between

animals from both groups. However, when the overall pO_2 and pCO_2 means for the first 6 h of life were taken into account, which represents the chronic, long-term blood gases profile, IVF-derived animals indeed displayed lower values for pO_2 and higher values for pCO_2 than *in vivo*-derived calves. Hence, those findings suggest that IVF-derived calves suffered a mild respiratory distress in the first four to six hours of life, contributing to increased pCO_2 and decreased pO_2 and O_2 saturation rate in those animals over time. Indeed, blood gases and acid-base balance parameters observed in IVF-derived calves in this study were similar to those found by Varga et al. (2001) in a group of newborn calves with clinical signs of acidosis, and may be indicative of poor adaptation to the extrauterine environment after birth. At birth, no significant differences were seen in blood gases and acid-base parameters between *in vitro*- and *in vivo*-derived calves, but a lower respiratory rate may have been an indication of a higher propensity to respiratory distress afterwards.

Most newborn calves go through a temporary mild metabolic and respiratory acidosis immediately after birth (BLEUL, 2009). However, pH and BE values, usually decreased in the first 30 to 60 minutes of life, tend to normalize after this period in healthy calves but not in calves with respiratory distress syndrome (BLEUL, 2009). In fact, plasma pH, HCO_3^- , BE and O_2 saturation rate were lower in blood of IVF-derived calves than in controls in many time points after birth, in particular during the first 6 h of life. In addition, an increase in cardiac rate was observed in IVF-derived calves in the first minutes of life, which may be a consequence of the lower pO_2 and O_2 saturation rate values or higher pCO_2 levels, usually observed in hypoxic newborn ruminants (PURVES, 1966).

Among the acid-base parameters observed in this study, pCO_2 could be highlighted to explain the physiological shifts seen in newborn calves during the first 24 h of life. Carbon dioxide (CO_2) is constantly formed in the body as a byproduct of intracellular metabolic processes (GUYTON and HALL, 2006), being eliminated mainly by the lungs through pulmonary ventilation (HYDE et al., 1968). Consequently, blood CO_2 accumulates if the production rate increases or if the elimination through the lungs is impaired, such as in cases of respiratory distress (GUYTON and HALL, 2006). Biochemically, CO_2 is converted in blood to carbonic acid (H_2CO_3), which rapidly dissociates in bicarbonate (HCO_3^-) and H^+ ions (GUYTON and HALL, 2006). Then, an increase in CO_2 would result in an initial increase of the concentrations of HCO_3^- and H^+ , lowering pH in extracellular fluid, as the pH is determined by the dissociated H^+ molarity in solution (GUYTON and HALL, 2006). In addition to decreased pH, pCO_2 may also affect blood HCO_3^- . When pCO_2 is high, part of the blood CO_2 is transported as

bicarbonate (BLEUL, 2009). Since HCO_3^- is an important buffer in cases of decreased pH in blood (GUYTON and HALL, 2006), bicarbonate is taken at a high level in cases of high pCO_2 , and H^+ . In turn, higher pCO_2 levels may shift the acid-base balance and cause respiratory acidosis (lower blood pH), which gradually reduces HCO_3^- and BE until metabolic compensatory mechanisms are initiated (GUYTON and HALL, 2006; BLEUL, 2009). Consequently, HCO_3^- and BE values drop in the blood, as observed in calves in this study, and as described previously for hypoxic newborn calves (TYLER and RAMSEY, 1991; BERTOLINI et al., 2004; BATCHELDER et al., 2007).

In addition to respiratory distress, some parameters observed in this study may also indicate metabolic acidosis in IVF-derived newborn calves. Usually, primary respiratory distress syndrome results in tissue hypoxia and reduced perfusion of peripheral tissues caused by circulatory centralization to vital organs (BLEUL, 2009). Consequently, the production of lactate from anaerobic metabolism increases. Although no specific time points showed any differences in plasma lactate concentrations between IVF- and SOV-derived animals in the first day after birth, a significant increase in lactate levels was observed during the first 12 h of life in the blood of animals from both experimental groups. Indeed, lactate concentrations in plasma tended to be negatively correlated with HCO_3^- and BE, irrespective of the experimental group. Since BE is almost universally used as the index of non respiratory acid-base imbalance (SEVERINGHAUS, 1985), and since BE was lower in IVF-derived animals than in SOV-derived calves, our findings indicate that IVF-derived animals had both respiratory and metabolic acidosis during the first hours of life. Moreover, the evidence that fructose metabolic activity is active in newborn calves is further supported by the close relationships observed between fructose and components of the acid-base balance: fructose plasma concentrations were negatively correlated with pH in IVF-derived calves and with pCO_2 in SOV-derived calves; aldolase B expression in the liver of newborn calves at birth was negatively correlated with pO_2 and O_2 saturation, irrespective of the group, being also positively correlated with fructose concentrations in the allantoic fluid and with blood pCO_2 ; also triokinase expression levels were negatively correlated with BE in IVF-derived calves, and fructose concentrations in the amniotic and allantoic fluids were positively correlated with pCO_2 in both experimental groups. Collectively, fructose does appear to have an influence on the metabolism and on the blood parameters associated with the acid-base balance, which in turn depends on the pulmonary function in newborn calves in the first hours of birth.

In cases of respiratory distress, an inverse relationship would be naturally expected between respiratory rate and venous $p\text{CO}_2$. However, it has been proposed that $p\text{CO}_2$ is influenced more by the depth of respiration than by the respiration rate itself (BOYD, 1989), what could mean that pulmonary function influences $p\text{CO}_2$ more than respiratory rate does. Yet, evaluating some other variables measured in this study, the statement above may be more in agreement with what we observed. Analyzing hematologic parameters, Grant and colleagues (2003) proposed an inverse relation between RDW values and lung function. Interestingly, IVF-derived calves had higher RDW values than controls. Also, RDW was negatively correlated with O_2 and $p\text{O}_2$ and positively correlated with plasma lactate concentrations, supporting the concept of respiratory distress in IVF-derived calves in this study. RDW values, soon after birth, were positively correlated with high birth weights. Nevertheless, when RDW values were adjusted to birth weight by ANCOVA, differences between groups persisted, demonstrating a true effect of the *in vitro* embryo production system on blood parameters, such as the RDW, in newborn calves.

Lower $p\text{O}_2$ and O_2 saturation levels, as observed in IVF-derived calves in this study, have important roles in the difficulties for the adaption to life after birth, being possibly the cause to a multitude of clinical and physiological consequences, as already discussed above. As oxygen consumption in newborn animals increase 3-fold above fetal levels in the first 2 days of life, most of which occurring in the first 12 h due in large part to energy expenditures for maintenance of thermal neutrality (TYLER and RAMSEY, 1991), newborn calves in hypoxic conditions seem to have difficulties in controlling body temperature. In fact, lower body temperatures were observed more often in *in vitro*-derived animals than in control calves during the first 24 h of life, especially during the first few hours of birth, as also reported previously (BATCHELDER et al., 2007). Coincidentally, such animals took longer to control blood gases and the acid-base balance during that same timeframe, suggesting that slower thermoregulatory response was a consequence of lower oxygen availability to oxidative energy metabolism, which is key for heat production in the body (GUYTON and HALL, 2006).

As described above, hypoxic conditions and differences in physical traits between *in vitro*- and *in vivo*-derived calves may bring profound consequences to energy metabolism in many distinct ways, and may also be related to lipid metabolism. Interestingly, IVF-derived calves had higher plasma HDL levels at birth, and higher triglyceride, total cholesterol and HDL levels at 6 h and 24 h of life than controls. The

increase in component of the lipid metabolism may be related to colostrums intake, but our findings are also partially in agreement with findings by Bruder et al. (2004); rats that underwent hypoxic conditions at birth had higher triglyceride and cholesterol value in the blood than normoxic rats, which may be related to higher adrenocortical corticosterone synthesis and secretion triggered by hypoxia after birth. Then, hypoxia and high energy demands are paradoxical conditions in the neonatal period, particularly if glucose and oxygen levels are lower. Then, lipid mobilization may be an alternative mechanism that gradually compensate the energy balance and lower glucose levels observed early after birth. In that regard, body size, respiratory function and metabolic profile may be intimately related. Indeed, the negative relationship observed between hindleg lengths and plasma glucose concentrations, lower oxygen contents in blood, respiratory and metabolic acidosis, slower response to increase body temperature and to stand, among others findings, also suggests a higher need for energy expenditure in IVF-derived calves. Interestingly, fructose concentrations in the amniotic fluid of IVF-derived calves positively correlated with plasma triglycerides and VLDL levels, which supports the idea that neonatal fructosemia may take part in the energy balance and may indirectly contribute to the hypoxic conditions and blood acidosis in early life after birth.

In summary, *in vitro*-derived newborn calves were heavier and larger at birth, with lower respiratory rate, and slower response for thermoregulation than *in vivo*-derived controls, with physiological and metabolic findings at birth being generally similar and normal between groups. Yet, IVF-derived calves displayed physiological, metabolic, biochemical, molecular, and blood features indicative of a lower adaptation to life *ex utero*, during the first 24 h of life, particularly in the first 4 to 6 h of life. Altogether, the main differences observed indicated that larger animals, mainly IVF-derived calves, with significant differences in the acid-base balance in early life, with evidence of a metabolic shift, elevation of metabolic substrates (mostly lactate), and a trend for acidosis followed by a compensatory normalization of the acid-base balance over time. Also, IVF-derived calves had more difficulties to maintain normal levels of blood gases and plasma oxygen levels, suggesting an imbalance of respiratory origin likely due to a less efficient hematosis, being a determinant or contributing factor in the difficulty experienced by IVF-derived calves to adapt to extrauterine life in the immediate neonatal period. Finally, even though the role of fructose in the neonatal metabolism and acid-base homeostasis has not been fully elucidated, our findings suggest that plasma fructose levels in newborn calves

may be metabolic and physiologically important to survival in the neonatal hebdomadal period.

4 CONCLUSÕES

- 4.1 Os resultados indicam que não somente a via metabólica da frutose está ativa em neonatos bovinos, como também parece contribuir para o metabolismo energético e o equilíbrio ácido-básico no período neonatal inicial. Porém, o papel fisiológico e metabólico da frutose foi aparente, mas não conclusivo.
- 4.2 A expressão gênica das enzimas frutoquinase, aldolase B, trioquinase, GAPDH, LDH-A e LDH-B foi detectada em tecido hepático de neonatos bovinos no período pós-parto inicial, reforçando observações de que a via metabólica da frutose está ativa nestes animais.
- 4.3 O sistema de cultivo *in vitro* de embriões, a antecipação do parto pela indução hormonal, com redução do período gestacional, e a raça utilizados neste experimento podem ter influenciado a frutosemia de neonatos bovinos derivados de embriões produzidos *in vitro*.
- 4.4 Os dados reportados neste estudo demonstram que, mesmo com a evolução dos sistemas de fecundação *in vitro* ao longo dos últimos anos, ainda há imperfeições na tentativa de mimetizar o que ocorre na natureza e, portanto, alguns animais oriundos de FIV ainda apresentam dificuldades de adaptação à vida extrauterina e devem receber atenção especial no período neonatal hebdomadal.

5 REFERÊNCIAS

- ALDORETTA, P.W. e HAY, W. Effect of glucose supply on ovine uteroplacental glucose metabolism. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 277, p. 947-958, 1999.
- ANTHONY, R.V. et al. Placental-fetal hormonal interactions: impact on fetal growth. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 1861-1871.
- AUSTIN, C.R. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. **Australian Journal of Scientific Research**, B4, p. 697-698, 1951.
- BATCHELDER, C.A. et al. Effect of the nuclear-donor cell lineage, type, and cell donor on development of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. **Cloning and Stem Cells**, v.7, n.4, p.238-254, 2005.
- BATCHELDER, C.A. et al. Perinatal physiology in cloned and normal calves: physical and clinical characteristics. **Cloning and Stem Cells**, v. 9, p. 77-96, 2007.
- BATTAGLIA, F.C. e MESCHIA, G. Principal substrates of fetal metabolism. **Physiological Reviews**, v. 58, p. 499-527, 1978.
- BAVISTER, B.D. Co-culture for embryo development: is it really necessary? **Human Reproduction**, v. 7, p.1339-1341, 1992.
- BAVISTER, B.D. et al. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. **Theriogenology**, v. 37, p.127-146, 1992.
- BAVISTER, B.D. Early history of *in vitro* fertilization. **Reproduction**, v. 124, p. 181-196, 2002.
- BEHBOODI, E. et al. Birth of large calves that developed from *in vitro*-derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 44, p. 227-232, 1995.
- BENDER, D.A. The pentose phosphate pathway and other pathway of hexose metabolism. In: MURRAY, R. et al. **Harper's Illustrated Biochemistry**. 28. ed. China: McGraw-Hill, 2009a, cap. 21, p. 174-183.
- BENDER, D.A. Glycolysis and the oxidation of pyruvate. In: MURRAY, R. et al. **Harper's Illustrated Biochemistry**. 28. ed. China: McGraw-Hill, 2009b, cap.18, p. 149-156.
- BERTOLINI, M. e ANDERSON, G.B. The placenta as a contributor to production of large calves. **Theriogenology**, v. 57, p. 181-187, 2002.
- BERTOLINI, M. et al. Morphology and morphometry of *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. **Theriogenology**, v. 58, p. 973-994, 2002a.

- BERTOLINI, M. et al. Growth, development and gene expression by *in vivo*- and *in vitro*-produced day-7 and day-16 bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, p.318–328, 2002b.
- BERTOLINI, M. et al. Evidence of increased substrate availability to *in vitro*-derived bovine foetuses and association with accelerated conceptus growth. **Reproduction**, v. 128, p. 341-354, 2004.
- BERTOLINI, M. et al. Expression profile and protein levels of placental products as indirect measures of placental function in *in vitro*-derived bovine pregnancies. **Reproduction**, v. 131, p. 163-173, 2006.
- BERTOLINI, M. et al. Developmental problems during pregnancy after *in vitro* during pregnancy after *in vitro* embryo manipulations. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 391-405, 2007.
- BETTERIDGE, K.J. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 203–244, 2003.
- BLEUL, U. Respiratory distress syndrome in calves. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 25, p. 179-193, 2009.
- BOYD, J.W. Relationships between acid-base balance, serum composition and colostrum absorption in newborn calves. **British Veterinary Journal**, v.145, p. 249-256, 1989.
- BRACKET, B.G. et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 147-158, 1982.
- BRUDER, E.D. et al. Metabolic consequences of hypoxia from birth and Dexamethasone treatment in the neonatal rat: comprehensive hepatic lipid and fatty acid profiling. **Endocrinology**, v.145, p. 5364-5372, 2004.
- CHANG, M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. **Nature**, v. 168, p. 697-698, 1951.
- CHANG, M.C. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. **Nature**, v. 184, p. 466-467, 1959.
- CONSTÂNCIA, M. et al. Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involve interaction between Igf2 α gene and placental transporter systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 102, p.19219-19224, 2005.
- CONSTANT, F. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. **Biology of Reproduction**, v.75, p.122-130, 2006.
- CROSIER, A.E. et al. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1375-1385, 2001.

- DIGGLE, C.P. et al. Kethexokinase: expression and localization of the principal fructose-metabolizing enzyme. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 57, p. 763–774, 2009.
- DORLAND, M. et al. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. **Journal of Reproduction Fertility**, v.13, p.70, 1994, abstr.
- EHRHARDT, R.A. and BELL, A.W. Developmental increase in glucose transporter concentration in the sheep placenta. **American Journal of Physiology**, v. 273, p. R1132-R1141, 1997.
- EYESTONE, W.H. e FIRST, N.L. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with tissue or in conditioned medium. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.85, p. 715-720, 1989.
- FARIN, P.W. e FARIN, C.E. Transfer of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*: survival and fetal development. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 676-682, 1995.
- FARIN, P.W. et al. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v. 55, p. 151-170, 2001.
- FARIN, P.W. et al. Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 178-191, 2006.
- FERNÁNDEZ-GONZALEZ, R. et al. Long-term effect of *in vitro* culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 101, p. 5880-5885, 2004.
- FERRELL, C.L. et al. Blood flow, steroid secretion and nutrient uptake of the gravid bovine uterus and fetus. **Journal of Animal Science**, v. 56, p. 656-667, 1983.
- FERRELL, C.L. e REYNOLDS, L.P. Uterine and umbilical blood flows and net nutrient uptake by fetuses and uteroplacental tissues of cows gravid with either single or twin fetuses. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 426-433, 1992.
- FLETCHER, C.J. et al. Somatic cell nuclear transfer in the sheep induces placental defects that likely precede fetal demise. **Reproduction**, v.133, p.243-255, 2007.
- GANDOLFI, F. e MOOR, R. Stimulation of early embryonic development in sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, p. 23-28, 1987.
- GARDNER, D.K. et al. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 390–400, 1994.
- GARRY, F.B. et al. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. **Theriogenology**, v. 45, p. 141-152, 1996.

- GERGER, R.P.C. **Fisiologia e metabolismo placentário por canulação cordonal em gestações de bovinos normais, FIV e clonados**. 2010. 172 f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de cirurgia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- GIRNIENE, J. et al. Inhibition of the D-fructose transporter protein GLUT5 by fused-ring glyco-1,3-oxazolidin-2-thiones and -oxazolidin-2-ones. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 711–719, 2003.
- GOODWIN, R.F.W. Division of the common mammals into two groups according to the concentration of fructose in the blood of the foetus. **Journal of Physiology**, v. 132, p. 146-156, 1956;
- GRANT, B.J.B. et al. Relation between lung function and RBC distribution width in a population-based study. **Chest**, v. 124, p. 494-500, 2003.
- GUYTON, A.C. and HALL, J.E. **Textbook of Medical Physiology**. 11. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006.
- GORDON, I.R. **Laboratory Production of Cattle Embryos**. 2. ed. Wallingford: CAB International, 2003.
- HASLER, J.F. et al. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v. 43, p. 141-152, 1995.
- HAY, W.W. Jr. et al. Effects of glucose and insulin on fetal glucose oxidation and oxygen consumption. **American Journal of Physiology**, v. 256, p. 704-713, 1989.
- HAY, W.W. Jr. Regulation of Placental Metabolism by Glucose Supply. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 365-375, 1995.
- HOLM, P. et al. Embryo viability, duration of gestation and birth weight in sheep after transfer of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized zygotes cultured *in vitro* or *in vivo*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 107, p. 175-181, 1996.
- HOLM, P. et al. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins **Theriogenology**, v. 52, p. 683–700, 1999.
- HOLM, P. et al. Kinetics of early *in vitro* development of bovine *in vivo*- and *in vitro*-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. **Reproduction**, v. 123, p. 553-565, 2002.
- HUGGETT, A.S.G. et al. The origin of the blood fructose of the foetal sheep. **Journal of Physiology**, v. 113, p. 258-275, 1951
- HYDE, R.W. et al. Rate of disappearance of labeled carbon dioxide from the lungs of humans during breath holding: a method for studying the dynamics of pulmonary CO₂ exchange. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 47, p. 1535-1552, 1968.

- IPE, D. Performing the Friedman test and the associated multiple comparison test using PROC GLM. **Proceedings of the Twelfth Annual SAS Users Group International Conference**, v. 12, p.1146–1148, 1987.
- INGERMANN, R.L. Control of placental glucose transfer. **Placenta**, v.8, p. 557-571, 1987.
- IRITANI, A. e NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 119-121, 1977.
- IWASAKI, S. et al. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* or *in vivo*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 279-284, 1990.
- JACOBSEN, H. et al. Ease of calving, blood chemistry, insulin and bovine growth hormone of newborn calves derived from embryos produced *in vitro* in culture systems with serum and co-culture or with PVA. **Theriogenology**, v. 54, p. 147-158, 2000.
- KAY, I. **Introduction to Animal Physiology**. 1. ed. Oxford, UK: Bios Scientific Publishers, 1998.
- KESKINTEPE, L. e BRACKET, B.G. *In vitro* developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 333-339, 1996.
- KHOSLA, S. et al. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 918-926, 2001.
- KRUIP, T.A.M. e DEN DAAS, J.H.G. *In vitro* produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. **Theriogenology**, v. 47, p. 43-52, 1997.
- LEE, R.S. et al. Cloned cattle fetuses with the same nuclear genetics are more variable than contemporary half-siblings resulting from artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first trimester. **Biology of Reproduction**, v.70, p.1-11, 2004.
- LENZ, R.W. et al. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. **Biology of Reproduction**, v. 29, p. 173-179, 1983.
- LITTELL, R.C. et al. Statistical Analysis of repeated measures data using SAS procedures. **Journal of Animal Science**, v. 78, p.1216-1231, 1998.
- MANOLESCU, A.R. et al. Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function. **Physiology**, v. 22, p. 234-240.
- MASSIP, A. et al. Calving outcome following transfer of embryos produced *in vitro* in different conditions. **Animal Reproduction Science**, v. 44, p. 1-10, 1996.

- MAYES, P.A. Intermediary metabolism of fructose. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, p. 754-765, 1993.
- MCGOWAN, J.E.; ALDORETTA, P.W.; HAY, W.W. Contribution of fructose and lactate produced in placenta to calculation of fetal glucose oxidation rate. **American Journal of Physiology**, v. 95, p. 834-839, 1995.
- MEZNARICH, H.K. et al. Fructose disposal and oxidation rates in the ovine fetus. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, v. 72, p. 617-625, 1987.
- MIGLINO, M.A. et al. Placentation in cloned cattle: Structure and microvascular architecture. **Theriogenology**, v. 68, p. 604-617, 2007.
- MILES, J.R. et al. Angiogenesis and morphometry of bovine placentas in late gestation from embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1919-1926, 2004.
- MILES, J.R. et al. Effects of embryo culture on angiogenesis and morphometry of bovine placentas during early gestation. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 663-671, 2005.
- MOOR, R.M. et al. Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation. **Theriogenology**, v. 21, p. 103-116, 1984.
- NIEMANN, H. e WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, v. 53, p. 21-34, 2000.
- NIXON, D.A. The transplacental passage of fructose, urea and meso-inositol in the direction from foetus to mother, as demonstrated by perfusion studies in the sheep. **Journal of Physiology**, v. 166, p. 351-362, 1963.
- PALMIERI, C. Placental abnormalities in ovine somatic cell clones at term: a light and electron microscopic investigation. **Placenta**, v. 28, p. 577-584, 2007.
- PARRISH, J.J. et al. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. **Theriogenology**, v. 24, p. 537-549, 1985.
- PARRISH, J.J. et al. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 1171-1180, 1988.
- PÈRE, M.C. Materno-foetal exchanges and utilisation of nutrients by the foetus: comparison between species. **Reproduction Nutrition Development**, v. 43, p. 1-15, 2003.
- PIETERSE, M.C. et al. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v. 30, p. 751-762, 1988.
- PINYOPUMMINTR, T. e BAVISTER, BD. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. **Theriogenology**, v. 41, p. 1241-1249, 1994.

- PURVES, M.J. The effects of hypoxia in the new-born lamb before and after denervation of the carotid chemoreceptors. **Journal of Physiology**, v. 185, p. 60-77, 1966.
- REXROAD, C.E. Jr. e POWELL, A.M. Co-culture of ovine ova with oviductal cells in medium 199. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 947-953, 1988.
- REZENDE, L.F.C. et al. Acetato de triancinolona como pré-indutor do parto de receptoras de embrião Nelore produzidos *in vitro*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, nº 1, 2009.
- REYNOLDS, L.P. et al. Growth hormone, insulin and glucose concentrations in bovine fetal and maternal plasmas at several stages of gestation. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 725-733, 1990.
- SACKS, D.B. Carbohydrates. In: **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. Philadelphia: WB Saunders, p. 750-808, 1999.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. 2ed. Belo Horizonte, Minas Gerais: Editora FEP MVZ, 2002.
- SCHMIDT, M. et al. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 46, p. 527-539, 1996.
- SENEDA, M.M. et al. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, v. 59, p. 1435-1440, 2003.
- SEVERINGHAUS, J.W. History of blood gases analysis. II. pH and acid-base balance measurements. **Journal of Clinical Monitoring**, v. 1, p. 259-277, 1985.
- SHAMSUDDIN, M. e RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Fine structure of bovine blastocysts developed either in serum-free medium or in conventional co-culture with oviductal epithelial cells. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 41, p. 307-316, 1994.
- SIRARD, M.A. e LAMBERT, R.D. *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. **Biology of Reproduction**, v. 33, p. 487-494, 1985.
- STEPTOE, P.C. e EDWARDS, R.G. Birth after the reimplantation of a human embryo. **The Lancet**, n. 2, p. 336, 1978.
- STROUD, B. IETS 2011 Statistics and data retrieval committee report. The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals, **IETS Newsletter**, v. 29, n. 4, p. 14-22, 2011.
- TAYLOR, K.A.C.C. A colorimetric fructose assay. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 53, p. 215-217, 1995.
- THIBIER, M. The embryo transfer industry in figures. A report from IETS data retrieval committee. **IETS Newsletter**, v. 19, n. 4, p. 16-22, 2001.
- THOMPSON, J.G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 263-275, 2000.

- THOMPSON, J.G. et al. Embryo culture and long-term consequences. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 43-52, 2007.
- TSOULOS, N.G. et al. Comparison of glucose, fructose, and O₂ uptakes by fetuses of fed and starved ewes. **American Journal of Physiology**, v. 221, p. 234-237, 1971.
- TYLER, H. and RAMSEY, H. Hypoxia in neonatal calves: effect on selected metabolic parameters. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 1957-1962, 1991.
- VAN SOOM, A. et al. Cell allocation to the inner cell mass and the trophectoderm in bovine embryos cultured in two different medias. **Molecular Reproduction Development**, v. 45, p. 171-182, 1996.
- VAN WAGTENGONG-DE LEEW, A.M. et al. Effects os different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology**, v. 53, p. 575-597, 2000.
- VANROOSE, G. et al. From co-culture to defined medium: State of the Art and Practical Considerations. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 25-28, 2001.
- VARGA, J. et al. Improved pulmonary adaptation in newborn calves with postnatal acidosis. **The Veterinary Journal**, v. 162, p. 226-232, 2001.
- VASQUES, M.L. et al. Levels of bPSPA throughout single and twin pregnancies after AI or transfer of IVM/IVF cattle embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 279-289, 1995.
- VIEIRA, A.D. et al. Calves born after OPS vitrification of immature bovine oocytes. **Cryobiology**, v. 45, p. 91-94, 2002.
- WALKER, D.G. The transmission of sugars across the goat placenta. **Biochemical Journal**, v. 74, p. 287-297, 1959.
- WRENZYCKI, C. et al. Gene expression patterns in *in vitro*-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 593-603, 2004.