



Universidade de Brasília

Ana Paula Delmas Küster

**Relatório de Estágio Curricular Supervisionado:
Biotecnologias da Reprodução utilizadas em Animais de
Produção**

Brasília

2012

Universidade de Brasília

Ana Paula Delmas Küster

**Relatório de Estágio Curricular Supervisionado:
Biotecnologias da Reprodução utilizadas em Animais de
Produção**

Monografia apresentada à banca examinadora da Universidade de Brasília, na área de concentração de reprodução animal como exigência final para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Ivo Pivato
Co-orientador: Margot Alves Nunes Dode

Brasília

2012

Relatório de Estágio Curricular Supervisionado: Biotecnologias da Reprodução utilizadas em Animais de Produção

Ana Paula Delmas Küster

Monografia apresentada à banca examinadora da Universidade de Brasília, na área de concentração de reprodução animal como exigência final para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Ivo Pivato
Co-orientador: Margot Alves Nunes Dode

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ivo Pivato

Universidade de Brasília

Dra. Margot Alves Nunes Dode

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira

Universidade de Brasília

Brasília, 25 de setembro de 2012

AGRADECIMENTOS

Aos que colaboraram com a elaboração desse trabalho e auxiliaram em meu aprendizado e desenvolvimento, pela dedicação e paciência, agradeço:

- a meu orientador na UnB, Dr. Ivo Pivato, pelo apoio e disposição demonstrados sempre que eu apresentava dúvidas;

- a Dra. Margot Alves Nunes Dode, pelo apoio e orientação no LRA I das diversas atividades desenvolvidas;

- aos queridos amigos e alunos de mestrado e doutorado, Ana Luiza, Sidney, Anelise, Andrielle, José Felipe, Mateus, Oscar, Gilberto e Vladinis pela convivência, carinho e, principalmente, paciência em ensinar e explicar *ipsis litteris* as etapas de cada técnica;

- no Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem, a Dra. Bianca pelo apoio e disposição em ajudar.

DEDICATÓRIA:

Dedico a meus pais, Paulo Cezar e Maria Célia, pois apesar da distância geográfica que nos aparta, sempre apoiaram e aumentaram minha autoestima. Devo-os todo meu desempenho, respeito e carinho por mais uma conquista. Incluo meu irmão, Pedro Henrique, minha bengala, nessa eterna luta da vida.

*“Home
is the story of love,
sorrow,
hope,
and
friendship
everlasting.”*

Nicholas Mazza

“Guarde a convicção de que todos estamos caminhando para adiante, através de problemas e lutas, na aquisição de experiência, e de que a vida concorda com as pausas de refazimento das nossas forças, mas não se acomoda com a inércia em momento algum.”

Xavier, Francisco Cândido.
Ditado pelo Espírito André Luiz.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIACÕES	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. IDENTIFICAÇÃO DO ESTÁGIO	2
1.2. PROPOSTAS E OBJETIVOS	2
2. LIMPEZA, LAVAGEM E ESTERILIZAÇÃO	3
2.1 LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL I	3
2.1.1 Estabelecimento.....	4
2.1.2 Equipamentos	4
2.1.3 Materiais	5
2.2 LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL II NO CAMPO EXPERIMENTAL SUCUPIRA ASSIS ROBERTO DE BEM	7
3. BIOTÉCNICAS AVANÇADAS DA REPRODUÇÃO	7
3.1 LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL I	7
3.2 LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL II NO CAMPO EXPERIMENTAL SUCUPIRA ASSIS ROBERTO DE BEM	12
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
4.1 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES (PIVE)	13
4.1.1 Histórico e importância	13
4.1.2 Ovogênese e foliculogênese	18
4.1.3 Aspiração folicular	21
4.1.3.1 <i>Ovum Pick up</i> (OPU)	24
4.1.3.2 Videolaparoscopia para aspiração folicular	25
4.1.4 Obtenção de folículos pré-antrais	27
4.1.5 Rastreamento, seleção de ovócitos e maturação <i>in vitro</i>	27
4.1.6 Análise de sêmen	29
4.1.6.1 Fluorescência	30
4.1.7 Fecundação <i>in vitro</i>	32
4.1.8 Cultivo <i>in vitro</i>	36
4.2 DESNUDAMENTO DE OVÓCITOS	38
4.3 FIXAÇÃO DE OVÓCITOS	38

4.4	COLORAÇÃO DE HOECHST	39
4.4.1	Em zigotos:.....	40
4.4.2	Em embriões:.....	41
4.5	MENSURAÇÃO DE FOLÍCULOS	42
4.6	MENSURAÇÃO DE OVÓCITOS E EMBRIÕES	42
4.7	PREPARAÇÃO DOS MEIOS E SOLUÇÕES	43
4.8	OUTRAS TÉCNICAS:	46
4.8.1	Manipulação hormonal	46
4.8.2	Transferência e colheita de embriões	47
5.	COMENTÁRIOS SOBRE O ESTÁGIO	48
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Plano de trabalho semanal sugerido no Laboratório de Reprodução Animal I.....	3
Tabela 2	Bioteχνologias; rotina de atividades acompanhadas durante o estágio no LRA I e quantidade de vezes observadas.....	8
Tabela 3	Bioteχνologias; rotina de atividades desenvolvidas durante o estágio no LRA I e quantidade de vezes executadas.....	9
Tabela 4	Acompanhamento das taxas de recuperação em função da data.....	9
Tabela 5	Total de ovócitos fecundados e avaliações dos <i>pools</i> de possíveis zigotos ou embriões durante o cultivo <i>in vitro</i> , com suas respectivas datas desde a aspiração folicular.....	11
Tabela 6	Bioteχνologias; rotina de atividades acompanhadas durante o estágio no LRA II, Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem, e quantidade de vezes observadas.....	12
Tabela 7	Bioteχνologias; rotina de atividades executadas durante o estágio no LRA II, Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem, e quantidade de vezes executadas.....	13
Tabela 8:	Classificação dos ovócitos quanto a qualidade das células do <i>cumulus</i> e ooplasma.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estudo baseado em dados reportados por técnicos brasileiros de transferência de embriões no ano de 2003.....	16
Figura 2	Gráfico com dados estatísticos da IETS para o ano 2010 de transferência de embriões em animais domésticos.....	17
Figura 3	Foto tirada no Laboratório de PIVE no LRA I. A: Sistema de bomba de vácuo. B: Aspiração folicular de ovário bovino....	23
Figura 4	Videolaparoscopia em ovino na sala de procedimentos do LRA II no Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem.....	26
Figura 5	Pipeta caseira com sua respectiva ponteira. Equipamento de manipulação de ovócitos, zigotos e embriões.....	29
Figura 6	Análise espermática com fluorescência de CTC em aumento de 1000x. A: espermatozoide capacitado e bactéria (seta); B: espermatozoide com reação acrossomal; C: espermatozoide não capacitado; D: espermatozoide central capacitado e com reação acrossomal, na lateral direita com reação acrossomal; E: contaminação por fungo e bactéria (seta).....	31
Figura 7	Coloração de Hoechst. Fluorescência em aumento de 200x destacando os pronúcleos dos zigotos.....	40
Figura 8	Coloração de Hoechst. Fluorescência em aumento de 200x destacando os núcleos dos blastômeros.....	41

LISTA DE ABREVIACÕES

AMP – adenosina monofosfato	LH – hormônio luteinizante
TALP – Tyrodes, Albumina, Lactato e Piruvato	MII – meiose 2
CASA – <i>computer assisted sperm analysis</i>	MIV – meio de maturação ou maturação <i>in vitro</i>
CCO – complexo <i>cumulus</i> ovócito	OPU – <i>ovum pick up</i>
CC – células do <i>cumulus</i>	PBS – <i>phosphate buffer saline</i>
CIV – cultivo <i>in vitro</i>	PCR – <i>polymerase reaction chain</i>
CTC – hidróclorido de clortetraciclina	PHE – penicilamina, hipotaurina e epinefrina
DNA – ácido desoxirribonucleico	PIVE – produção <i>in vitro</i> de embriões
Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	PNA – lecitina de amendoim (<i>peanut agglutinin</i>)
FEC – meio de fecundação	RNA – ácido ribonucleico
FIV – fecundação <i>in vitro</i>	SFB – soro fetal bovino
GnRH – hormônio liberador de gonodotrofina	SOF – meio de cultivo (fluido de oviduto sintético)
LAV – meio de lavagem	Sptz – espermatozoide
LRA – laboratório de reprodução animal	ZP – zona pelúcida

1. INTRODUÇÃO

A produção de embriões *in vitro* (PIVE) no Brasil vem gradativamente ocupando seu espaço no mercado interno, sendo também de grande importância no mercado internacional, principalmente pelo seu grande desempenho em selecionar bovinos superiores zootecnicamente e geneticamente, da raça Nelore. Atualmente garantiu a primeira posição para o país como maior produtor de embriões bovinos *in vitro* do mundo. Dessa forma, para manter essa classificação e também a qualidade do produto, empresas vem se qualificando e colaborando com linhas de pesquisas para o aprimoramento das técnicas envolvidas com a PIVE.

Como exemplo, a Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, criada em 26 de abril de 1973, possui sede em Brasília e 47 unidades de pesquisa e serviços espalhadas em todas as regiões do Brasil. Mais especificamente, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, unidade localizada em Brasília, tem como missão viabilizar soluções de pesquisa, desenvolvimento e inovação em recursos genéticos para a sustentabilidade da agropecuária brasileira. Tem atuado no cenário nacional e internacional, gerando conhecimento e patenteando produtos, processos e serviços (EMBRAPA, 2011).

Nessa unidade da Embrapa, no departamento de Pesquisa e Desenvolvimento está incluso uma série de unidades laboratoriais, Laboratórios do Núcleo Temático de Biotecnologia, entre os quais se encontra o Laboratório de Reprodução animal I (LRA), situado no próprio prédio da unidade de Recursos Genéticos e Biotecnologia, e o LRA II, o qual se localiza a 35km do Plano Piloto, chamado de Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem, que, conforme Embrapa (2011), “também abriga raças de animais domésticos ameaçados de extinção (bovinos, suínos, ovinos, equinos, caprinos e asininos) do Banco Brasileiro de Germoplasma Animal e alguns bancos de espécies florestais nativas e exóticas”.

O LRA iniciou pesquisas relacionadas à produção *in vitro* em 1990, obtendo o primeiro embrião gerado totalmente *in vitro* em 1994; as primeiras crias por aspiração folicular e fecundação *in vitro* em 1996 e o primeiro embrião oriundo de bezerra com três meses de idade por punção folicular em 2000 (EMBRAPA, 2011).

Em consequência dos grandes esforços nas áreas de pesquisa, hoje a Embrapa possui nome e respeito em se tratando de biotecnologias da reprodução de animais, principalmente os da espécie de produção.

1.1. IDENTIFICAÇÃO DO ESTÁGIO

Área de estágio: Biotecnologias da Reprodução Animal

Local: Laboratório de Reprodução Animal I - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; Laboratório de Reprodução Animal II - Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem.

Endereço: Parque Estação Biológica – PqEB W/5 Norte Final - CEP: 70770-917 - Brasília - DF e Riacho Fundo.

Orientador de estágio: Dra. Margot Alves Nunes Dode

Orientador acadêmico: Prof. Dr. Ivo Pivato

Período de estágio: 01 de março de 2012 a 30 de junho de 2012

Carga horária: 30 horas semanais

1.2. PROPOSTAS E OBJETIVOS

- Relatar a rotina em um laboratório de biotecnologias da reprodução animal;
- Identificar os pontos de controle higiênico e sanitário em um laboratório;
- Revisão bibliográfica da PIVE;
- Expor os protocolos e explicar as biotécnicas.

2. LIMPEZA, LAVAGEM E ESTERILIZAÇÃO

Seguindo a ordem de informações disposta no subtítulo 1.2, esse trabalho inicia com exposição de atividades presenciadas nos dois LRA (I e II).

2.1 LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL I

Apesar dos laboratórios possuírem semelhantes planos de trabalho, cada um com uma rotina pré-determinada, é importante ressaltar que todos devem cumprir o proposto ao final da semana. Segue na tabela 1 o plano de trabalho semanal sugerido no LRA I, para o perfeito funcionamento dos laboratórios. Estas atividades estavam sujeitas a adequações ou modificações.

Tabela 1. Plano de trabalho semanal sugerido no Laboratório de Reprodução Animal I

Plano de trabalho				
Segunda-feira	Terça-feira	Quarta-feira	Quinta-feira	Sexta-feira
Aferir temperatura das estufas; Medição de CO ₂ – Bacharat; Troca de água das estufas; Trocar caixas de ponteiras; Colocar bulbos para lavar e esterilizar (ou sempre que sujar);	Lavar banho-Maria;	Limpeza pesada do laboratório – bancadas, fluxo laminar, chão; Limpeza dos pipetadores; Verificação da calibragem dos pipetadores;	Trocar caixas de ponteiras;	Revisão Geral – verificação se tudo está nos conformes para o final de semana.

Os subitens a seguir demonstrarão certas diferenças quanto ao dia da semana proposto para tais atividades, pois como já referido, adequar-se-ão às rotinas. Todos os procedimentos apresentados a seguir são baseados no manual de práticas de condutas laboratoriais do LRA I.

2.1.1 Estabelecimento

Todos os compartimentos e cômodos do LRA-I são higienizados com uso de água sanitária, detergente hospitalar e pano limpo nos pisos, no mínimo duas vezes por semana. As atividades são separadas em sete laboratórios: genética molecular animal, micromanipulação, PIVE, criobiologia, cultivo de células, lavagem e esterilização e sala de preparo de meios; o acesso é controlado em áreas que exijam antissepsia severa. Nos laboratórios de PIVE e micromanipulação, antes de qualquer procedimento, a radiação ultravioleta (UV) é usada por no mínimo 15 minutos pelo menos uma vez ao dia antes do início das atividades, com finalidade de promover ação germicida no ambiente todo. Nesses dois laboratórios novamente, a presença de uma antessala tem o intuito de impedir a entrada excessiva de pessoas e sujidades, possui também um local onde o técnico deverá vestir jaleco limpo e despi-lo ao sair. Todos os laboratórios são providos de tanque inoxidável, detergente, papel toalha descartável e álcool etílico 70% para lavagem e assepsia das mãos, equipamentos e superfícies.

2.1.2 Equipamentos

As cubas de armazenamento de materiais sujos são higienizadas após uso, lavando-se com detergente e esponja e enxaguando com água corrente. A água destilada com as quais são preenchidas é trocada diariamente.

Lupas estereoscópicas, microscópios ópticos e de campo invertido, pipetadores, bancadas, qualquer superfície ou equipamento utilizados serão borrifados com álcool 70% para manutenção da assepsia, evitando contaminações nos experimentos realizados. Cuidados a serem observados antes e após uso.

Para conservação do banho-maria, autoclave e estufas a água é trocada semanalmente. Ainda com referência às estufas, fica em imersão na água um fragmento de cobre que proporciona ação fungicida.

Ao descartar a água do banho-maria, simultaneamente efetua-se a limpeza com sabão Extran®, mãos protegidas por luvas de procedimento, pois este produto tem alto poder detergente, e água corrente. Novamente enxágua-se, porém utilizando água destilada

para garantia de uma completa remoção de resíduos. Borrifa-se a superfície da cuba com álcool etílico 70%, objetivando eliminar possíveis contaminantes. Ao final, caso esse aparelho seja requerido, preencher com aproximadamente 5 litros de água destilada. Preferencialmente, na rotina do laboratório de PIVE do LRA I, esse procedimento é realizado às sextas-feiras, possibilitando sua total secagem durante o final de semana.

A limpeza geral das estufas tem frequência semestral. Todavia, pode haver necessidade de ser realizada antes do prazo, visto que o ambiente é propício à proliferação bacteriana e fúngica. A água da cuba é trocada semanalmente. O procedimento de limpeza é o mesmo realizado no banho-maria. A calibragem dos níveis de gases lançados no ambiente interno é aferida pelo aparelho Bacharach (níveis de CO₂ devendo estar a 5,0%) e pelo próprio mensurador da estufa (níveis de O₂ a aproximadamente 20%).

Ao manusear os pipetadores sempre ter cuidado para não aspirar meio demais ou de maneira abrupta, o que pode levar o produto a sua parte interna, contaminando-os. São guardados em graduação máxima e limpos com álcool etílico 70% diariamente. Também testar calibragem semanalmente e anotar. A cada 1 ou 2 meses, desmontar, limpar internamente e, se preciso, colocar para autoclavar.

2.1.3 Materiais

Os ovários bovinos, oriundos de abatedouros da região, são armazenados em compartimento isotérmico, em recipientes de vidro para uso em laboratório. Após utilização, esses recipientes são encaminhados para uma sala identificada por “Laboratório de Lavagem e Esterilização”, onde serão enxaguados com água para retirada de excesso de matéria orgânica e, posteriormente, com o auxílio de esponja e detergente, é realizada a lavagem por remoção mecânica e química, sendo novamente enxaguados. Em prateleira distante de materiais limpos, sobre papel toalha, a secagem é ao natural. Não se efetua a esterilização, pois não há necessidade.

Para lavagem de materiais de uso geral, em uma cuba contendo 20 L de água destilada aquecida por ebulidor, insere-se 400 mL de Extran® MA 02, na qual são colocados todos materiais utilizados pelos laboratórios, já pré-enxaguados, com exceção de ponteiras, recipientes de ovários ou sujos de óleo e tubos de microcentrífuga, pois contaminarão o conteúdo da cuba e todos os materiais nela contidos. Em seguida, é

executada a lavagem com detergente e esponja não utilizando a sua parte áspera, no intuito de evitar arranhaduras que possam permitir acúmulo de matéria orgânica, microrganismos e biofilmes. Lava-se com água corrente e, por fim, enxágua-se aproximadamente sete vezes com água destilada, proporcionando total remoção de resíduos químicos.

Materiais contendo óleo mineral são colocados em recipiente próprio para futuro descarte, não permitindo sua eliminação direta na pia. O material contendo resíduo de óleo em suas paredes será lavado com detergente, esponja ou escova, somente para este fim e enxaguado com água quente. Esse procedimento será repetido tantas vezes quanto necessário a fim de removê-lo completamente. No entanto, se for de plástico, não será reaproveitado.

Materiais perfurantes e ponteiras não são reciclados, sendo descartados em recipientes plásticos próprios.

Toda vidraria e materiais plásticos, com exceção dos recipientes de ovários e conectores, são dispostos em estufa para secagem por tempo variável. Após, são separados em três categorias: plásticos, vidros e placas de petri plásticas e pipetas de Pasteur.

Plásticos que suportam temperatura e pressão são acondicionados em embalagem plástica com auxílio de uma seladora e esterilizados em autoclaves a temperatura de 120°C por 15 minutos, garantindo a integridade desses materiais mais frágeis. Recipientes como tubos de centrífuga de 15 ou 50mL devem ser frouxamente cerrados antes de serem embalados, evitando sua deformação. Os conectores serão autoclavados no interior de um tubo de centrífuga de 15mL, com tampa semi-aberta,

Vidros vedados contendo soluções, assim como o grupo citado acima podem ser esterilizados em autoclave.

Bocas de recipientes de vidros são lacradas com papel alumínio e dispostas em estufa de esterilização a 200°C por 120 minutos. Após, por cima do papel alumínio, as bocas são novamente seladas com filme ZAP® VCI. Este é um produto feito de material inibidor volátil de corrosão (*Volatile Corrosion Inhibitor*), útil principalmente para metais expostos à umidade, acidez e salinidade pela simples liberação do princípio ativo na atmosfera fechada (ZAP, 2012).

Os demais materiais (placas de petri plásticas...) passam pela mesma metodologia citada anteriormente, sendo também acondicionados em embalagem plástica e lacrados, porém esterilizados em microondas. Essa técnica é realizada colocando um frasco de vidro contendo água no interior do microondas e ao redor as placas de petri plásticas e pipetas de Pasteur. Permanecem por 5 minutos na potência de 100W. Ao término, são

deixadas mais 1 minuto, para que o vapor de água formado se encarregue de esterilizar os materiais.

Para reposição de ponteiras, as caixas de armazenamento são lavadas e posteriormente preenchidas em fluxo laminar na “Sala de Preparo de Meios”, com uso de máscara e luva, para depois serem autoclavadas. A troca das caixas de ponteiras é efetuada a cada 3 ou 4 dias, no máximo.

2.2 LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL II NO CAMPO EXPERIMENTAL SUCUPIRA ASSIS ROBERTO DE BEM

Não há diferença quanto aos procedimentos de lavagem e esterilização. Porém, para entrar no laboratório que se situa próximo à área de procedimentos com animais, (como palpação retal, ultrassonografia, aspiração folicular, transferência e coleta de embriões), roupas utilizadas externamente - como macacão e botas – na entrada do laboratório são trocados por jaleco e chinelos, os quais não devem deixar o estabelecimento. O fluxo de saída do laboratório é diferente da entrada. Essa planta arquitetônica funciona como barreira contra contaminações advindas do meio externo.

3. BIOTÉCNICAS AVANÇADAS DA REPRODUÇÃO

Após exposição das formas de controle higiênico e sanitário dos LRAs, prossegue-se com as técnicas observadas durante o estágio.

3.1 LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL I

As biotécnicas acompanhadas durante o período de três meses foram a produção *in vitro* de embriões (PIVE) cujas etapas serão elucidadas no trabalho em

questão. Dentre essas, estão: punção folicular ovariana, MIV (maturação *in vitro*), análise espermática pela fluorescência, FIV (fecundação *in vitro*), CIV (cultivo *in vitro*). Outras técnicas que não fazem parte, mas são convenientemente ressaltadas: dissecação de folículos ovarianos, desnudamento de ovócitos, fixação de ovócitos, mensuração de ovócitos e embriões e coloração para contagem de blastômeros de embriões e para verificar maturação nuclear em ovócitos.

Todas as manipulações e observações realizadas durante as etapas da PIVE, maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, são efetuadas em fluxo laminar horizontal, sendo as placas mantidas em mesas aquecidas.

A título de análise, a tabela 2 demonstra as atividades acompanhadas e na tabela 3 as atividades desenvolvidas durante o estágio no LRA I.

Tabela 2. Biotecnologias; rotina de atividades acompanhadas durante o estágio no LRA I e quantidade de vezes observadas.

Biotecnologias	Quantidade de dias não consecutivos de biotecnologias realizadas
Aspiração folicular com escalpe	24
Rastreamento e seleção	24
Maturação <i>in vitro</i>	24
Desnudamento de ovócitos	11
Fixação de ovócitos e coloração com Lacmóide	4
Fecundação <i>in vitro</i>	24
Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	8
Leitura do CIV (D2, D6, D7, D8)	7
Coloração de embriões com Hoechst	3
Dissecação de folículos ovarianos	19
Ovários em <i>tissue chopper</i>	3
Mensuração de folículos	10
Mensuração de ovócitos	1
Mensuração de embriões	10
Análise de sêmen	5
Fluorescência de espermatozoides	6
Produção de meios	4
Limpeza do banho-maria	1
Limpeza da estufa	1
Limpeza e descarte de materiais de rotina	36

Tabela 3. Biotecnologias; rotina de atividades desenvolvidas durante o estágio no LRA I e quantidade de vezes executadas.

Biotecnologias	Quantidade de dias não consecutivos de biotecnologias realizadas
Aspiração folicular com escalpe	14
Rastreamento e seleção	13
Maturação <i>in vitro</i>	13
Desnudamento de ovócitos	13
Fixação de ovócitos e coloração com Lacmóide	13
Fecundação <i>in vitro</i>	9
Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	10
Leitura do CIV (D2, D6, D7, D8)	9
Coloração de embriões com Hoechst	5
Dissecação de folículos ovarianos	19
Mensuração de folículos	2
Análise de sêmen	5
Produção de meios	7
Limpeza do banho-maria	11
Limpeza da estufa	5
Limpeza e descarte de materiais de rotina	37
Produção de capilares (pipeta de manipulação)	5

O acompanhamento da taxa de recuperação de ovócitos, após as etapas de aspiração folicular, rastreamento e seleção, maturação *in vitro* e fixação, está descrita na tabela 4, haja vista que se observa um relativo aumento dessa taxa à medida que se pratica as biotécnicas.

Tabela 4. Acompanhamento das taxas de recuperação em função da data.

Data	Quantidade de:					
	ovários aspirados	Média folículos/Ovário	folículos aspirados	ovócitos rastreados (%)	ovócitos selecionados (%)	ovócitos fixados
07/mar	3	31,33	94	47 (50)	13 (27,66)	11 (24h)
08/mar	6	14,33	86	46 (53,49)	12 (26,09)	12 (24h)
12/mar	11	8,45	93	53 (56,99)	15 (28,3)	8 (24h)
14/mar	5	16,6	83	47 (56,63)	13 (27,66)	12 (24h)
21/mar	6	14	84	67 (79,76)	47* (70,15)	
26/mar	12	9,33	112	47 (41,96)	17* (36,17)	
29/mar	8	19,37	155	94 (60,64)	43* (45,74)	
03/abr	9	13	117	41 (35,04)	35 (85,37)	35 (0h)
05/abr	10	17,1	171	79 (46,2)	30* (37,97)	15 (0h)
10/abr	12	13,25	159	122 (76,73)	52* (42,62)	21 (0h)

*ovócitos destinados à fecundação *in vitro*.

Ocorre uma notável perda de ovócitos ao longo das etapas. Durante a aspiração folicular, muitos ovócitos ficam retidos no folículo. A agulha ao perfurá-lo permite algumas vezes que o líquido folicular extravasado carregue a célula consigo sem que esta seja aspirada. A taxa de recuperação é em torno de 50%. Observa-se que há uma progressiva melhora na taxa de recuperação, quanto mais é praticada essa biotécnica.

Existe expressiva redução da quantidade de ovócitos selecionados com grau 1 e 2 segundo a classificação de Caixeta et al. (2009), o qual é justificado pelo excessivo tempo gasto durante as etapas e principalmente devido a variação individual dos animais. Nos dias em que os ovócitos foram destinados para FIV, o tempo foi cronometrado, sendo gastos no máximo 45 minutos durante o rastreamento, seleção e colocação dos ovócitos para maturar *in vitro*. No entanto, a grande disparidade dos resultados de ovócitos selecionados entre os dias 21 e 29 de março, 03, 05 e 10 de abril são explicados pela inclusão de células de grau 3 com ooplasma homogêneo para maturar.

Nos valores de ovócitos fixados, observa-se uma perda, principalmente no mês de março, devido às sucessivas pipetagens promoverem ruptura da zona pelúcida e membrana plasmática das células. Pode ser explicada pela grande demora e falta de prática.

No dia 05/abril metade dos ovócitos foram destinados à fixação e outra parte foi descartada ou perdida por ruptura devido às pipetagens. No entanto, no dia 10/abril dos 52 selecionados, todos foram direcionados a FIV, recolhendo-se mais 21 ovócitos de qualidade 1 e 2 do *pool* para fixar.

Na tabela 5, que dá continuidade à tabela 4, é mostrado o total de ovócitos que foram fecundados e as avaliações em lupa estereoscópica dos *pools* de possíveis zigotos ou embriões durante o cultivo *in vitro*.

Tabela 5. Total de ovócitos fecundados e avaliações dos *pools* de possíveis zigotos ou embriões durante o cultivo *in vitro*, com suas respectivas datas desde a aspiração folicular.

Data	FIV	CIV					
		D2			D6	D7	D8
		Total	C	>4 células			
21/mar	47	47	19 (40,4%)	-	2Mc; 1Bl (2,1%)	1Bl; 1Bx (4,2%)	3Bx; 1Bl (8,5%)
26/mar	17	17	11 (64,7%)	-	1Bi; 1Bl (5,9%)	1Bi; 1Bl; 1Bx (17,6%)	2Bx; 1Be (17,6%)
29/mar	43	34	18 (52,9%)	11 (32,3%)	3Mc; 1Bi (2,9%)	-	-
10/abr	52	46	22 (47,8%)	13 (28,3%)	2Mc (0%)	3Mc (0%)	-

FIV: fecundação *in vitro*; CIV: cultivo *in vitro*; D2: dois dias após fecundação; D6: seis dias após fecundação; D7: sete dias após fecundação; D8: oito dias após fecundação; C: clivados; (-): não observado; Mc: mórula; Bi: blastocisto inicial; Bl: blastocisto; Bx: blastocisto expandido.

Nos dias 29/março e 10/abril houve redução de 9 e 6 possíveis zigotos, respectivamente. Provavelmente em consequência de erro técnico durante o processo de mudança de meio FEC para SOF.

As melhores taxas de clivagem permearam nos dias 26 e 29 de março, justificadas pela maior prática adquirida e auxílio dos alunos de mestrado, pois no dia 10 de abril a técnica foi realizada sem assistência.

As avaliações dos dias 29/março no D7 e D8 e 10/abril no D8 não foram observadas, pois a primeira coincidiu com o feriado de Páscoa e a segunda devido à transferência do estágio do LRA I para a fazenda Sucupira, logo não podendo estabelecer um padrão nas taxas de blastocistos.

A partir do último relato de CIV na tabela 5, taxas de clivagem e de blastocistos incluíram-se na ata de controle da rotina do laboratório de foliculogênese. Nessa ata, durante o período de 09 de janeiro de 2012 a 18 de maio de 2012, foram obtidos taxas médias para clivagem de 70,69%; blastocistos em D7 de 38,57% e blastocistos em D8 de 38,68%.

Dois dias de estágio foram exclusivos para acompanhamento das atividades na área de biologia molecular e clonagem.

3.2 LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL II NO CAMPO EXPERIMENTAL SUCUPIRA ASSIS ROBERTO DE BEM

As biotécnicas realizadas no campo foram: manipulação hormonal, inseminação artificial, coleta de embriões, transferência de embriões, mensuração de corpo lúteo com auxílio de ultrassom, palpação retal, *Ovum Pick Up*, coleta de sêmen com o uso de vagina artificial e casqueamento em bovinos. Em ovinos videolaparoscopia com aspiração folicular, ultrassonografia e coleta de sêmen com vagina artificial. Já no laboratório, foram acompanhadas PIVE, criopreservação e vitrificação de embriões e criopreservação de sêmen bovino. Essas atividades foram cumpridas em um período de 23 dias (18 a 27 de abril e 11 a 29 de junho, excetuando-se os dias do fim de semana). A tabela 6 apresenta o total de vezes em que foram acompanhadas as biotecnologias e na tabela 7 constam as atividades executadas.

Tabela 6. Biotecnologias; rotina de atividades acompanhadas durante o estágio no LRA II, Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem, e quantidade de vezes observadas.

Biotecnologias	Quantidade de dias não consecutivos de biotecnologias realizadas
Videolaparoscopia com aspiração folicular	2
Curativo da videolaparoscopia	2
Manipulação hormonal	11
Inseminação artificial	4
Aspiração folicular com seringa	4
OPU	2
PIVE	1
Criopreservação de embriões	5
Vitrificação de embriões	3
Criopreservação de sêmen	2
Coleta de embriões	4
Coleta de sêmen (vagina artificial)	5
Transferência de Embriões	5
Mensuração de CL por US em vacas	3
Palpação retal	5
Casqueamento	1
US em ovelhas	2

OPU: *Ovum Pick Up*; PIVE: *produção in vitro* de embriões; CL: corpo lúteo; US: ultrassonografia.

Tabela 7. Biotecnologias; rotina de atividades executadas durante o estágio no LRA II, Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem, e quantidade de vezes executadas.

Biotecnologias	Quantidade de dias não consecutivos de biotecnologias realizadas
Curativo da videolaparoscopia	2
Manipulação hormonal	6
Aspiração folicular com seringa	1
Coleta de embriões	2
Coleta de sêmen (vagina artificial)	1
Palpação retal	5

No presente relatório não foram descritas atividades englobando outras espécies, pois no curto período de estágio na fazenda não houve possibilidade de acompanhar todos os experimentos dos estudantes de mestrado, envolvendo pesquisas com suínos e equinos.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

De acordo com o estágio curricular supervisionado em Biotecnologias da Reprodução de Mamíferos, a revisão bibliográfica é voltada para as biotécnicas acompanhadas ou executadas durante esse período, com ênfase na produção *in vitro* de embriões.

4.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE)

4.1.1 Histórico e importância

Revisando de maneira cronológica o trabalho de Betteridge (2003), o qual menciona detalhadamente o histórico das biotecnologias, incluindo o surgimento de certas preocupações, tais como de doenças infecciosas, conforme o descobrimento das mesmas; foi no ano de 1890 em Manchester o primeiro relato de embrião obtido por TE em animal

(coelho) e em 1932/33, no Texas, em pequenos ruminantes, como ovinos e caprinos. No entanto, gestação era quase impossível de ser obtida pelo descaso com a sincronização da doadora e receptora, por isso da importância de conhecer a manipulação hormonal.

O cultivo *in vitro* de embrião iniciou-se em 1912 e em 1934, na Inglaterra, aconteceu o primeiro relato de FIV; contudo, foi denominado duvidoso por ter ocorrido algumas interferências da fecundação *in vivo*. Porém, foi no ano de 1940, na França, que pesquisadores se aprofundaram nessa técnica em coelhos. Em 1945, época da II guerra mundial, a TE foi desestimulada na Europa, embora seu potencial tenha retornado logo em seguida devido a escassez de alimento. O contrário ocorreu nos EUA. Nos anos 40, iniciou-se a TE em bovinos com trabalho sobre superovulação. Conceituações de aprimoramento genético por seleção dos doadores, conhecimento sobre fisiologia do gameta e aplicabilidade da TE estavam em pauta nos congressos da época. Nessa mesma década muitas tecnologias foram descobertas, as quais não resultaram em produtos. Situação esta modificada nos anos 50, com o nascimento de fetos das espécies ovinas (Polônia), suínas (Ucrânia), bovinas (USA) a partir de TE. A técnica ainda era limitada, com produção aquém de óvulos que requisitavam cirurgia. Também foram conduzidas pesquisas para a área molecular.

Nos anos 60, a técnica cirúrgica para coleta e transferência de embriões estava em alta em Cambridge. Porém, o Japão também envolvia em suas pesquisas a técnica transcervical não cirúrgica. Como esta última não resultava em boas taxas de recuperação, a primeira metodologia prevaleceu até meados de 1970, pois era impraticável a campo. Foi relatado o primeiro nascimento de bezerro pelo método transcervical, em 1964. Trabalhos foram realizados também em ovinos, caprinos e suínos.

Foi na década de 70 que surgiu a técnica de congelamento de embrião e seu aprimoramento, utilizando mórulas tardias ou blastocistos iniciais, que são mais resistentes ao congelamento e descongelamento. Em 1973 nasceu o primeiro bezerro a partir de blastocisto congelado/descongelado. Também foi melhorada a técnica de sincronização de cio pela administração de prostaglandina F_{2α} e análogos. Houve progresso nas técnicas de MIV e FIV e em 1977 o primeiro ovócito bovino fecundado *in vitro*.

Na década 80 ocorreu considerável progresso na micromanipulação de embriões, FIV e biologia molecular. O assunto da aplicabilidade em humanos estava repercutindo muito na mídia. Na metade da década, o advento da técnica de PCR e o uso de *Y-specific probe* que tornou a sexagem de embriões mais eficaz. Houve expansão na área de TE englobando equinos e animais ameaçados de extinção, como também o uso da

aspiração folicular e subsequente MIV. Pesquisas sobre o potencial de doenças infecciosas transmissíveis por TE foram estimuladas.

Nos anos 90, a PIVE que antigamente era direcionada a negócios agropecuários, contribuiu também com a área farmacêutica e médica. Pesquisas sobre células-tronco surgiram e a PIVE tornou-se rotina adotando técnicas mais rebuscadas como a OPU, ICSI e imagem e monitoramento de ovócitos para estudo de estrutura e função. Preocupação com encefalopatia espongiiforme e febre aftosa tornou-se relevante, modulando o uso das técnicas. A criopreservação de embriões em suínos e equinos; contudo, permanecia ineficaz.

Esta breve cronologia evolutiva das biotecnologias de reprodução traz à atualidade um caminho promissor à produção de embriões em escala industrial e comercial, no resgate de espécies ameaçadas de extinção além do contínuo aprimoramento das técnicas.

A PIVE possibilita aumentar a propagação de material genético de fêmeas zootecnicamente superiores buscando um melhoramento genético da espécie, logo, da produção (BELTRAME et al., 2010). O Brasil encontra-se na liderança da produção de embriões bovinos *in vitro* atualmente, com grande repercussão no gado de raça Nelore (PONTES et al., 2011 apud THIBIER, 2006; STROUD, 2011). Porém, devem-se considerar, nas técnicas de reprodução assistida, problemas de parentesco próximo entre gerações trazidos pelo uso do mesmo doador de sêmen (GORDON e LU, 1990).

No Brasil, a produção de embriões obtidos a partir da coleta *in vivo*, as regiões Sudeste e Centro-Oeste têm destaque como campeãs entre 1997 e 2007 na transferência de embriões, com total de 338.407 e 249.804, respectivamente. Entretanto a partir de 2004 houve uma redução no número de coletas de embriões no país em decorrência do grande desenvolvimento e aplicabilidade da FIV (BELTRAME et al., 2010). Essa biotécnica começou a ser preferida por proporcionar rapidez na obtenção de resultados e perspectiva de menores custos tomando por referência as características reprodutivas do gado zebuino, levando em consideração maior número de gestações em menor período de tempo (BELTRAME et al., 2010; PONTES et al. 2011). As regiões mencionadas permaneceram na frente em relação ao total de aspirações foliculares realizadas assim como o número total de embriões viáveis obtidos pela técnica FIV entre 1997 e 2007, com 301.503 e 133.542, respectivamente (BELTRAME et al., 2010).

Foi relatada por Pontes et al. (2011) que o Brasil colaborou em 2003 com 56,5% da produção mundial de embriões *in vitro*, valores são representados no diagrama

da figura 1. É um estudo referente à pesquisa de dados de reportagens de técnicos brasileiros de TE.

Segundo os dados estatísticos da IETS para o ano 2010 de TE em animais domésticos, o Brasil liderou novamente na PIVE com 264.263 embriões produzidos *in vitro* de um total de 451.000 mundiais (contribuindo com 58,6%) e em coleta de embriões equinos por lavagem uterina (STROUD, 2011). O gráfico da figura 2 compara os valores de PIVE relatadas no mundo, ressaltando a grande contribuição do Brasil nessa área da reprodução.

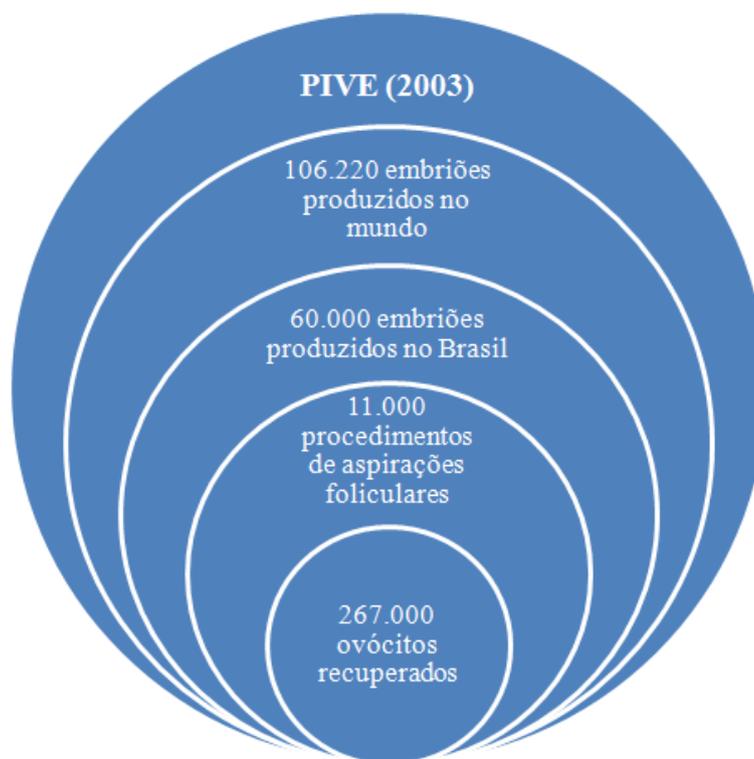


Figura 1. Estudo baseado em dados reportados por técnicos brasileiros de transferência de embriões no ano de 2003.

PONTES et al., 2011

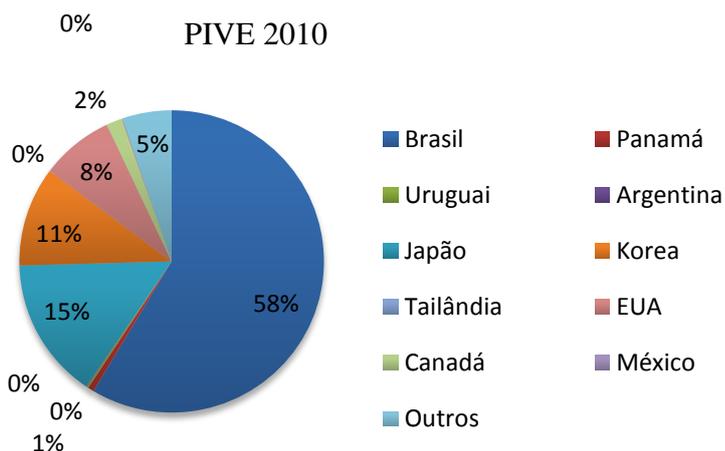


Figura 2. Gráfico com dados estatísticos da IETS para o ano 2010 de transferência de embriões em animais domésticos. STROUD, 2011

O rebanho brasileiro é composto aproximadamente por 80% por animais da raça Nelore, sendo que as fêmeas *Bos indicus* tem algumas particularidades que as diferenciam da subespécie *taurus* (PONTES et. al., 2011). Normalmente são criados em clima tropical e subtropical, ambientes quentes e úmidos, que diminuem consideravelmente o desempenho reprodutivo, o desenvolvimento ponderal e produção (FERREIRA, 2012).

Características essas como resistência ao estresse térmico (FERREIRA, 2012), ocorrência de 3 a 4 ondas foliculares por ciclo estral, diferentemente do taurino que tem entre 2 a 3 ondas; recrutamento de maior número de folículos > 5mm por onda de crescimento folicular; promoção de uma maior resposta ao tratamento superovulatório; diâmetro do folículo dominante variar de 5,4 a 6,2mm e dos subordinados de 5,3 a 5,9mm; folículo dominante ser responsivo ao LH quando seu diâmetro atinge 7,0 a 8,4mm, ou seja, a capacidade ovulatória é adquirida com diâmetros menores em relação ao taurino; indução da ovulação em protocolos de superestimulação ser obtida precocemente; diâmetro máximo alcançado pelo folículo dominante em duas ondas de crescimento folicular ser de: 11,3 e 12,1mm, e no caso de três ondas: 10,4; 9,4 e 11,6mm.

O corpo lúteo da raça zebuína é também menor, variando de 17 a 21mm, entretanto as concentrações de progesterona permanecem mais elevadas decorrentes do metabolismo diferenciado, devendo tomar cautela ao empregar tratamentos com progesterona para não diminuir a pulsatilidade de LH e comprometer o crescimento folicular (BARUSELLI; GIMENES e SALES, 2007; PONTES et al., 2011). Fatores distintos esses que indicam vantagens de fêmeas zebuínas sobre as taurinas para técnica de

transferência de embriões e OPU-PIVE e explicam o porquê do rebanho brasileiro ser constituído majoritariamente por zebuínos. Essa relação também está correlacionada ao alto valor agregado no mercado pelo Nelore, que já perdura por uma década (PONTES et al., 2011).

4.1.2 Ovogênese e foliculogênese

A foliculogênese e ovogênese são eventos fundamentais para melhor entender as etapas da produção *in vitro* de embriões. São didaticamente separados, no entanto estão intimamente associados.

Para dar início à ovogênese, os progenitores dos gametas femininos, que são as células germinativas primordiais, migram para as respectivas gônadas em desenvolvimento no período embrionário através da invaginação do intestino posterior. Após a formação estrutural da crista genital, os cordões sexuais aparecem (nos bovinos aos 30 dias e ovinos aos 20 dias de gestação – GONÇALVES, 1999) e as células germinativas mantêm ativamente sua proliferação por mitose seguida da diferenciação em ovócitos ou espermatozoides. A determinação sexual dos gametas depende da constituição cromossômica da crista, de suas células somáticas se tornarem em ovários ou testículos, respectivamente (ALBERTS et al., 2004).

A partir das gônadas femininas, nas quais células germinativas originam as ovogônias, é iniciada a ovogênese, que sofrem mitoses consecutivas gerando os ovócitos primários ($2n$). Sucedendo a primeira divisão meiótica, conforme Aberts et al., (2004), no qual “o DNA é replicado, de modo que cada cromossomo consiste de duas cromátides-irmãs, os cromossomos homólogos duplicados pareiam ao longo de seu eixo longitudinal, e a recombinação ocorre entre as cromátides não-irmãs desses cromossomos pareados”, estacionando em diplóteno da prófase I antes do nascimento, ficando até puberdade. Durante o período de prófase I é marcado pela formação de grânulos corticais, zona pelúcida pela síntese de três glicoproteínas (ZP1, ZP2 e ZP3), e cromossomos de aparência plumosa, denotando a intensa atividade de síntese de RNA (ALBERTS et al., 2004).

Na puberdade, as alterações hormonais são significantes e exercem grande influência na próxima etapa, a maturação *in vivo* de ovócitos primários, atingindo finalmente a maturidade sexual. O hipotálamo nesse momento perde gradualmente sua

hipersensibilidade ao estrógeno, não mais bloqueando por *feed-back* negativo o eixo hipotalâmico-hipofisário, aumentando a liberação de GnRH, sendo mais frequentes os pulsos desse hormônio, estimulando a secreção de gonodotrofinas e, por conseguinte, a produção de esteroides pelos ovários, iniciando os ciclos (GONÇALVES, 1999). A divisão meiótica é retomada pelo pico de LH chegando até a metáfase II, na puberdade. Concomitantemente, ocorre a maturação mitocondrial, com produção de ATP e acúmulo de energia para os posteriores eventos (ASSAF, 2007) e alterações como divisões redutivas ocorrem a nível nuclear (ANTUNES et al., 2008), relatadas pelo autor Alberts et al. (2004), em que o envelope nuclear é rompido, os cromossomos homólogos replicados, antes de aspecto plumoso, sofrem condensação e separam-se na anáfase I gerando dois núcleos-filho haploides compostos de duas cromátides-irmãs.

A divisão assimétrica citoplasmática produz duas células (n), uma de tamanho desproporcionalmente reduzido, o corpúsculo polar, e a outra extremamente maior, o ovócito secundário em metáfase II, que ocorreria nessa etapa a ovulação em bovinos. Ulterior a esse evento, outra divisão é procedida com a continuidade da meiose II, exibindo um grande ovócito maduro, também denominado como ovotídeo ou óvulo, e um segundo corpúsculo polar, ambos contendo grupos de cromossomos haplóides (n). No entanto, esta última etapa será concluída somente se houver fecundação. Os corpúsculos polares estão envoltos pela zona pelúcida do ovócito, no espaço perivitelino, e entrarão em degeneração (ALBERTS et al., 2004; ANTUNES et al., 2008).

Estrategicamente, o ovócito atrasa a primeira divisão meiótica, com intuito de crescer rapidamente possuindo cópias extras de genes, pois seus grupos cromossômicos ainda estarão em diploidia e duplicata (4n), ou seja, maior quantidade de material genético (DNA) disponível para síntese de RNA. Esse estágio é fundamental, pois o acúmulo de ribossomos para síntese proteica será necessário para suprir a demanda durante o período inicial da embriogênese (ALBERTS et al., 2004).

Coexistindo, a foliculogênese ou ascensão de um folículo dominante carece de diversos fatores, tais como mecanismos endócrinos, parácrinos e autócrinos. Logo, para mimetizar esses recursos de um ambiente ovariano fisiológico, componentes hormonais, fatores de crescimento entre outros constituintes nos meios de cultivo, descritos no subtítulo 4.7, deverão desempenhar essas funções (GONÇALVES, 1999).

Durante o período fetal inicia-se o desenvolvimento folicular, continuando até a senescência (GONÇALVES, 1999). Ao longo da ovogênese, a fase de crescimento rápido do ovócito, antes de atingir puberdade (na prófase I), está intimamente associada ao

desenvolvimento folicular. A partir do momento que o ovócito atinge diâmetro aproximado de 100 μ m, concomitante ao início do aparecimento do antro folicular, seu crescimento se estabiliza podendo atingir diâmetro de 130 μ m (BESSA, 2011), em contrapartida o folículo por estímulos hormonais hipofisários prossegue em seu desenvolvimento (ANTUNES et al., 2008). Nesse período, o folículo passa por três etapas: recrutamento, o qual está sob ação de elevadas concentrações plasmáticas de FSH; seleção, por meio de maior liberação de IGF (fator de crescimento semelhante a insulina) que potencializa ação das gonodotrofinas estimulando seu crescimento continuado; dominância, o qual é estabelecida pela grande secreção de estrógenos e inibina pelo folículo, que por consequência vão reduzir os níveis de FSH circulantes por *feed-back* negativo, fazendo com que os outros folículos entrem em atresia. Esse folículo dominante é capaz de continuar seu crescimento até que chegue à ovulação, pois começa a expressar receptores de LH nas células da granulosa, tornando-se dependente somente a este hormônio gonodotrófico. É com o pico de LH que a ovulação ocorrerá, a qual também é determinada pela ausência de corpo lúteo secretando progesterona, hormônio inibidor do pico de LH e responsável pela manutenção da gestação, que acarretaria na atresia do folículo dominante. Repetindo-se todo esse processo: recrutamento, seleção, e dominância, de 2 a 4 ondas foliculares, em 21 dias na espécie bovina, denominado de ciclo estral (GONÇALVES, 1999).

Anatomicamente, os folículos são estruturas formadas por células epiteliais, somáticas, dispostas ao redor do gameta feminino em desenvolvimento, proporcionando ambiente adequado e nutrição dos ovócitos através do fornecimento, pelas junções comunicantes tipo gap na membrana plasmática, de micromoléculas precursoras de macromoléculas. Estas últimas, por sua vez, adentram a célula por endocitose ou contribuem para o controle do padrão de assimetria espacial e axial pela atividade nos receptores de membrana. Uma das causas de infertilidade, por impedimento do desenvolvimento das células da granulosa e ovócito, é a mutação do gene codificante da conexina Cx37, responsável pelas conexões intercelulares das células da granulosa e entre estas e o ovócito (ALBERTS et al., 2004).

Para determinar histologicamente a diferença do crescimento folicular, foi estabelecido como folículo primordial o ovócito em potencial circundado por uma única camada de células pavimentosas com algumas cuboides e membrana basal; por mitoses aumentam as células da granulosa tomando formato cúbico, sendo este designado como folículo primário. Continuando o crescimento folicular, o ovócito em seu interior aumenta de diâmetro e surge a zona pelúcida envolvendo-o. Mais camadas da granulosa emergem

por mitose dando origem ao folículo secundário. Inicia-se durante a vida fetal em bovinos, a formação do antro pela atividade secretora e acúmulo de fluido entre as células da granulosa sob a ação de gonodotrofinas hipofisárias, que vão dissociar-se formando a coroa radiata (camada de células foliculares radiais), a qual circunda a zona pelúcida. O aparecimento do antro e multiplicação das células da granulosa dá origem ao folículo terciário. Prosseguindo, o ovócito é pressionado lateralmente sendo envolto por células foliculares (células do *cumulus*) que se conectam a membrana da granulosa. O folículo maduro é determinado quando atinge o diâmetro máximo, entre 12 a 19mm (GONÇALVES, 1999; HAFEZ e HAFEZ, 2003; ANTUNES et al., 2008).

4.1.3 Aspiração folicular

Segundo Gordon e Lu (1990), metodologias que permitam a extração de ovócitos *in vivo*, tais como a utilização de um protocolo de superovulação na vaca doadora, são dispendiosas. Portanto, caso o objetivo seja a obtenção dessas células para pesquisas e testes de protocolos, mais sensato e menos custoso seria a utilização de ovários de abatedouros, além de também proverem grande taxa de recuperação. Opção esta seguida durante o estágio curricular.

Na rotina da Embrapa, ovários provenientes de abatedouros locais são encaminhados ao laboratório de PIVE do LRA I, imersos em solução salina a 0,9% suplementada com penicilina G (100UI/mL) e sulfato de estreptomicina (50µg/mL) em recipiente de vidro estéril e preferencialmente em compartimento térmico, como caixa de isopor contendo água entre 32°C a 35°C, na tentativa de manutenção de ambiente e temperatura fisiológica de 37°C. Há estudos que testaram a permanência do ovário a 20°C por um período máximo de 8 horas sem observar grande comprometimento dos ovócitos com relação à maturação e fertilização (GORDON e LU, 1990). Durante transporte, sempre verificar a temperatura, pois se houver grande variação, esta deverá ser levada em consideração ao longo dos estudos, pois pode influenciar nos resultados. Na recepção, os ovários são lavados com solução salina 0,9% estéril previamente aquecida e realocados com o líquido em recipientes de vidro, o qual permanecerá em banho-maria durante a aspiração. Todo sistema é disposto em fluxo laminar, do tipo horizontal, que fornece

melhor proteção estéril para reagentes e meios de cultivo, devendo este ser ligado 30 minutos antes de qualquer procedimento.

O tempo entre a coleta e processamento não deve exceder 12 horas, a fim de não prejudicar a viabilidade das células. Preferencialmente entre 4 e 6 horas contabilizando o tempo de saída dos ovários do abatedouro até o momento do início da maturação dos ovócitos em estufa, garantindo melhores taxas de clivagem.

Anteriormente a punção folicular e manuseio dos ovários, estes são secos em papel toalha autoclavado e aspirados com agulha do escalpe (18G) não logo acima dos folículos e sim lateralmente a estes, no tecido ovariano para depois direcionar a agulha ao folículo, demonstrado na figura 3 B. Preferencialmente, puncionar grande maioria de uma só vez, quanto menos perfurar o ovário, melhor. Aprofundar a agulha em direção ao centro, na tentativa de recuperar aqueles que não são visíveis.

Com auxílio de escalpe conectado a uma bomba de vácuo, efetua-se a aspiração folicular, mais rapidamente que quando realizado com seringa, utilizando uma pressão de aspiração de 10 a 15 mL/min. No entanto, a taxa de recuperação desses ovócitos é relativamente menor, que será compensada pela velocidade da operação, fator de grande relevância em uma linha de produção de embriões *in vitro* (GORDON e LU, 1990).

O sistema de aspiração por bomba de vácuo, indicado na figura 3 A, funciona através da conexão desta por uma mangueira de silicone a um erlenmeyer. Frasco este que deverá ser vedado por uma rolha de borracha e que a partir desta sairá outra mangueira de silicone, porém menos calibrosa conectada a uma agulha 40mmx12 perfurando a tampa de borracha do tubo de centrifuga de 15 mL. Essa agulha deverá ser acoplada superficialmente, evitando que o líquido folicular e ovócitos aspirados sejam encaminhados ao erlenmeyer, no caso de aspirar o líquido deste tubo. Novamente, partindo deste tubo, sairão outras duas agulhas, de tamanho já referido, que estão conectadas a dois escalpes 18 ou 19 G por conectores, permitindo que dois operadores realizem a aspiração simultaneamente. Todos os materiais utilizados deverão estar estéreis. Selam-se os acoplamentos com filme ZAP® VCI, não permitindo o escape de ar. Normalmente são aspirados de 6 a 10 ovócitos por ovário provenientes de folículos de diâmetro entre 3 e 8mm.

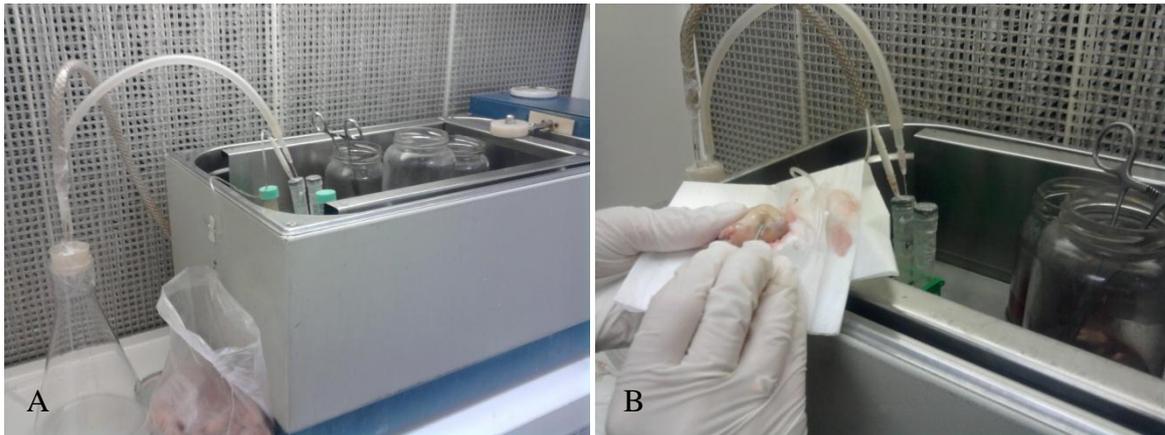


Figura 3. Foto tirada no Laboratório de PIVE no LRA I. A: Sistema de bomba de vácuo. B: Aspiração folicular de ovário bovino.

Para melhores resultados, todo procedimento deve ser executado em fluxo laminar e banho-maria ligados previamente, bancadas e materiais de uso limpos com etanol 70%. Uso de luvas de procedimento é fundamental, assim como assepsia correta das mãos. As mangueiras devem sofrer trocas diárias e consecutivamente a pressão de vácuo deverá ser calibrada para uma padronização do sistema. É ideal a troca do escalpe a cada 20-30 ovários aspirados ou quando achar necessário, visto que a agulha perde seu poder de perfuração e com isso diminui a eficiência de recuperação dos ovócitos.

Os ovócitos após serem transferidos a tubos estéreis, vedados com tampas de borracha, permanecerão em banho-maria por 10 minutos para que ocorra a sedimentação celular. O sobrenadante que é o líquido folicular é retirado com pipetador automático, centrifugado a 700G por 5 minutos para retirar o excesso de células epiteliais do meio, o que o torna mais límpido, servindo como meio no qual os ovócitos serão rastreados. O PBS pode substituir o líquido folicular. O sedimento formado é constituído de células epiteliais e dos complexos *cumulus* ovócitos, sendo coletado por pipeta e depositado em placa petri (100X20) contendo o líquido folicular centrifugado para diluir o sedimento contendo os ovócitos facilitando o rastreamento. Todos os aparatos devem ser mantidos a temperatura de 37°C.

Sempre levar em consideração que à medida que os ovócitos são aspirados, apesar de estarem em meio inibidor da meiose (líquido folicular), o processo de maturação se inicia continuando até a FIV. Isso explica a importância de atuar de forma mais ágil possível durante os procedimentos da PIVE (ASSAF, 2007).

4.1.3.1 *Ovum Pick up* (OPU)

Na Fazenda Sucupira, pelo programa de divisão de distribuição dos ovários de abatedouro, todas as sextas-feiras os mesmos eram reservadas a este laboratório para posterior PIVE. No entanto, outras metodologias de obtenção de ovócitos eram realizadas, como *Ovum Pick up*, nomenclatura em inglês para designar a retirada de ovócitos de folículos de animais *in vivo* por meio do uso de ultrassom. Esta tecnologia é também conhecida como aspiração folicular guiada por ultrassom.

Os animais eram contidos em bretes apropriados para espécie bovina e aplicado uma dose de 4mL de anestésico local Cloridrato de Lidocaína (0,02g/mL) com vasoconstritor epinefrina ($0,2 \times 10^{-4}$ g/ml) pela via epidural entre a última vértebra sacral e a 1ª coccígea. Após bloqueio, era verificada a eficácia do procedimento anestésico pela tonicidade da cauda, a qual era contida com elástico. A vulva era higienizada com água corrente e detergente neutro, seguido de secagem com papel toalha e aspersão superficial com álcool etílico 70%, o excesso era removido com papel toalha.

Era usada mucilagem (Carboximetilcelulose) sobre luva de palpação e guia de aspiração no intuito de lubrificar e evitar danos às mucosas retal e vaginal. Primeiro era introduzido a guia de aspiração e depois o braço pelo reto, com o objetivo de segurar o ovário e aproximá-lo da guia de aspiração para visualização dos folículos no monitor do ultrassom. Era determinado a busca de folículos maiores que 3mm de diâmetro utilizando um ultrassom Aloka SSD500, acoplado a uma sonda convexa de 7.5 MHz, montada na guia de aspiração. Nesta também havia um sistema de aspiração composto por uma agulha 18G conectada ao tubo coletor (tubo de centrífuga de 50mL) através de uma mangueira (0.8 m de comprimento e 2 mm de diâmetro interno). A aspiração foi realizada usando uma bomba de vácuo com uma pressão negativa de 10–12 mL de água/min. O meio de aspiração era composto por PBS acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB), 5mg /mL de sulfato de gentamicina e 10,000 IU/L de heparina sódica. O material aspirado era passado em filtro coletor de embriões com auxílio do PBS suplementado com 5% de SFB, para diluir o sangue que era aspirado junto com os ovócitos e facilitar a visualização dos mesmos. A busca era feita em placa petri (100X20), os CCOs eram retirados, classificados e colocados em MIV.

Em desavença, no trabalho de Pontes et al. (2011) incluíam-se também folículos de 2mm. Também em seu estudo, diferenças não foram relatadas na produção de

ovócitos quando animais eram submetidos a sessões de OPU consecutivas (intervalo menor que 15 dias entre aspirações), apesar de ocorrerem variações individuais entre doadoras. No LRA II seguia-se aproximadamente o mesmo intervalo entre aspirações, sem que pudesse observar diferenças drásticas.

4.1.3.2 Videolaparoscopia para aspiração folicular

Como esse procedimento é considerado cirúrgico, ovelhas permaneceram em jejum alimentar de 24h e hídrico de 12h. Foi aplicado previamente sedativo cloridrato de xilazina a 2% na dose de 0,07mg/Kg e cetamina 0,1g/mL na dose de 0,1-0,2mL/Kg. Após, realizou-se a contenção em decúbito dorsal em maca de metal, posicionando os membros esticados e amarrados com elásticos sem que formasse garrote. Foi realizada tricotomia na região abdominal. Feita a antissepsia rigorosa com sabão e água corrente, seguida de álcool iodado com gaze estéril em forma de espinha de peixe, e o animal era encaminhado à sala de videolaparoscopia, inclinando a maca de forma que os membros pélvicos ficassem mais elevados que os torácicos. Desta forma, possibilitando fácil acesso à cavidade abdominal. Efetuaram-se botões anestésicos de 2mL, aprofundando na musculatura e adjacências com Cloridrato de Lidocaína 2%, nos três locais de onde seriam inseridos os trocateres. Foi realizado uma pequena incisão com lâmina de bisturi voltada para cima, no tamanho ideal de maneira que permitisse a passagem dos trocáteres estéreis à cavidade. Um orifício era destinado à pinça de manipulação (posicionamento e fixação dos ovários), outro para ótica com fonte de luz xênon e o último para o acesso com agulha de aspiração folicular (0,12x40mm). A insuflação da cavidade com CO₂ objetivava facilitar a visualização dos órgãos, da mesma forma a injeção de soro no trocáter da ótica para desembaçar a lente. A imagem era transmitida ao vídeo em tempo real, conforme mostra a figura 4.

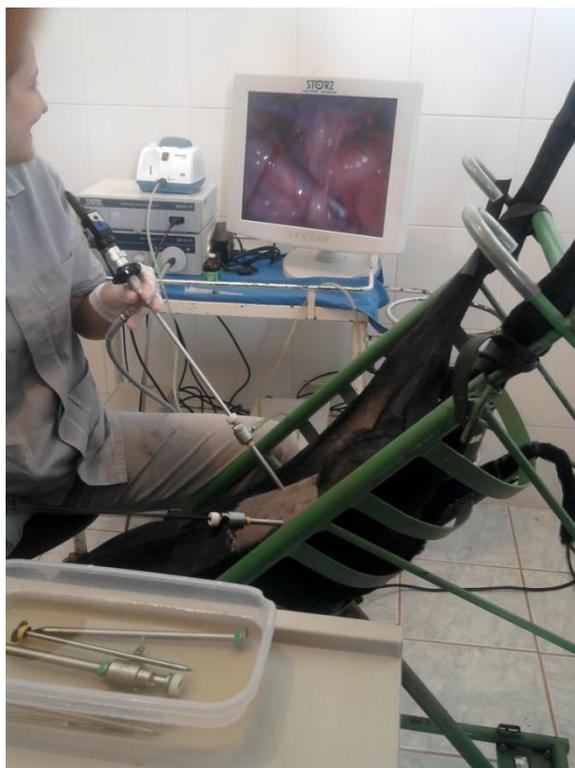


Figura 4. Videolaparoscopia em ovino na sala de procedimentos do LRA II no Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem.

Ao término era feito um curativo tópico com antibiótico oxitetraciclina (de concentração 200mg/mL para uma dose de 0,1mL/Kg); por cima unguento e Matabicheira Fort Dodge Spray[®]. Em alguns animais, preferiu-se suturar o subcutâneo com ponto tipo simples contínuo e epiderme com Wolff interrompido devido algumas aberturas estarem demasiadamente grandes, pois normalmente não há necessidade.

A taxa de recuperação na primeira vez não foi boa, obtendo dois ovócitos/ovelha, sendo que do total, dois encontravam-se degenerados. Normalmente obtém-se 5 ovócitos/ovelha em sessões de videolaparoscopia.

No entanto, na segunda vez, obtiveram-se três ovócitos desnudos e um de grau 3 para um animal; três de grau 3 para outra ovelha e na última cinco desnudos, dois de grau 3 e dois de grau 2. Essas taxas foram relativamente melhores se comparadas a primeira vez. Provavelmente isso ocorreu devido a falha técnica ou falta de prática na primeira vez.

4.1.4 Obtenção de folículos pré-antrais

Em equipamento Tissue Chopper, a região cortical (onde encontram-se os folículos) separada do restante do ovário com auxílio de lâmina de bisturi era fatiada em espaçamentos de aproximadamente 1mm nas direções longitudinais e transversais (BESSA, 2011), lavada com PBS e transferida para tubo cônico. Com pipeta de Pasteur, mistura-se o conteúdo por vinte vezes, no intuito de separar as células da granulosa dos folículos, posteriormente é filtrado em outro tubo, permitindo que somente folículos pré-antrais (primordiais, primários, secundários iniciais e finais) livres de células e tecido passem. Recolhe-se o pellet sedimentado (algumas células e ovócitos) e deposita-o em placa de Petri (100X20) misturando com PBS e 10% soro fetal bovino. Em microscópio invertido, rastreiam-se os folículos transferindo-os para uma gota de 200µl de meio LAV. Após lavagem no meio LAV, são lavados novamente em meio PBS de congelamento, ou seja, sem cálcio e magnésio, e os folículos selecionados após classificados com seus respectivos diâmetros foliculares: < 20 µm (folículos primordiais); entre 25 e 35 µm (folículos primários); 40 e 60 µm (folículo secundário inicial); 65 e 85 µm (folículo secundário final) (BESSA, 2011) eram congelados separadamente em microtubo contendo PBS de congelamento em freezer a -80°C para futura extração de DNA ou RNA. A título de facilitar o trabalho no momento da extração, eram transferidos até dez folículos em cada microtubo.

4.1.5 Rastreamento, seleção de ovócitos e maturação *in vitro*

Antes de acrescentar conteúdo na placa de petri grande, como descrito no subitem 4.1.3, são tracejados no fundo da placa linhas retilíneas com aproximadamente 1cm de distância com auxílio de objeto pontiagudo, como agulha, para facilitar o rastreamento de ovócitos. Assim, o campo de visualização na lupa se torna mais limitado, facilitando a localização.

Após rastreamento, todos os ovócitos encontrados são direcionados a outra placa de petri, no entanto menor (50X15) contendo meio de lavagem (LAV – TCM-Hepes com 10% de soro fetal bovino) ou líquido folicular centrifugado. Em seguida, na lupa, os

ovócitos eram classificados quanto a qualidade, descrita na tabela 8, sendo selecionados os de qualidade 1 e 2, os quais são considerados os mais capazes de dar continuidade ao processo de maturação, fecundação e desenvolvimento.

Tabela 8. Classificação dos ovócitos quanto a qualidade das células do *cumulus* e ooplasma.

Qualidade	<i>células do cumulus</i>		Ooplasma
	Camadas	Aspecto	
1	Múltiplas	Densa, compacta, rodeando todo ovócito	Homogêneo, granulações finas
2	Mín. 5	Compacto, envolvendo todo ovócito	Homogêneo com pequenas áreas de pigmentações irregulares
3	Mín. 3	Revestindo ou não completamente	Heterogêneo/vacuolizado
4	Menos que 3	Completamente ou parcialmente ausente, células expandidas	Heterogêneo

Fonte: CAIXETA et al. (2009).

Imediatamente, prepara-se outra placa, identificando-a com caneta permanente e adicionando-se 200µl de meio para maturação *in vitro* (MIV) coberto com óleo mineral delicadamente para não misturarem. Antes da passagem para esse meio de maturação já estabilizado, efetua-se a lavagem dos CCOs em 200 µl de meio MIV em outra placa. Posteriormente coloca-se para maturar em estufa a temperatura de 39°C, com concentração de CO₂ a 5,0%, O₂ aproximadamente a 20% e umidade relativa de 95%, por 22 a 24 horas. Toda a operação de seleção até o momento de ir para a incubadora deve durar no máximo 45 minutos. Na identificação de qualquer produto, deve constar no fundo da placa ou lateral: data, nome do técnico responsável, fase do processo (MIV, FIV, CIV), número da amostra e, se necessário, a quantidade de ovócitos ou de embriões. Em relação da quantidade de meio, gotas de 50µl suportam até 10 estruturas, 100µl até 15, 150µl até 20 e 200µl acima de 25.

É importante que todos os procedimentos sejam realizados no menor tempo possível para evitar variações de temperatura, pH e muito contato com luminosidade. Por isso qualquer operação fora da estufa com os ovócitos ou embriões deve ser realizada o mais ágil possível, contudo com qualidade e confiança.

A título de comparação, em Dublin, diferentemente do LRA I, ovócitos em prófase I são maturados por 24 a 26 horas na quantidade de 40 células em 2mL de meio de maturação, obtendo mais de 90% de ovócitos em metáfase II (GORDON e LU, 1990).

A pipeta de manipulação de ovócitos e embriões utilizada no LRA na Embrapa é produzida com mangueiras de silicone do calibre semelhante ao do escalpe e do equipo de soro, cortados em tamanho ideal para compressão com o dedo indicador e polegar. Uma extremidade é obstruída por pedaço de capilar ocluído e na outra será inserida a ponteira fabricada a partir de tubo capilar esticado pelo calor. Na figura 5 o esquema de idealização deste sistema.

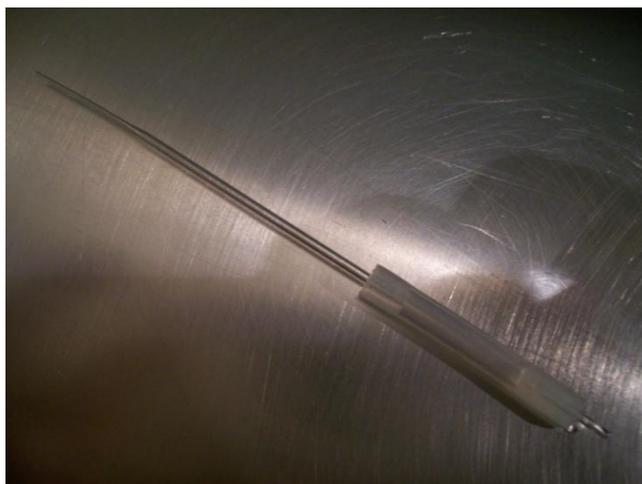


Figura 5: Pipeta caseira com sua respectiva ponteira. Equipamento de manipulação de ovócitos, zigotos e embriões.

4.1.6 Análise de sêmen

O sêmen sofre uma primeira avaliação no local de coleta, ou seja, no Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem. No laboratório, são analisados aspectos macroscópicos (volume, cor, aspecto) e microscópicos (turbilhão, motilidade, vigor e concentração).

Após todo processo, se atingir padrões mínimos exigidos pelo Manual de Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998): 70% de motilidade e vigor 3; será criopreservado e armazenado em botijão de nitrogênio líquido, a uma temperatura de -196°C , preservando a qualidade.

No laboratório, uma palheta será descongelada a 37°C por 20 a 30 segundos e avaliado sua concentração, vigor e motilidade progressiva, sendo feita de forma subjetiva em microscópio de campo invertido. Uma amostra é levada para análise no CASA[®]. O programa CASA[®] (Computer Assisted Sperm Analysis) realiza a análise de sêmen

computadorizada por um *software* e *hardware* permitindo visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fazendo leitura de diversos parâmetros da motilidade individual celular de forma acurada, fornecendo ao fim um resumo estatístico (MATOS et al., 2008). Segundo Matos et al. (2008) este sistema é excelente na quantificação de “um grande número de células com padrão de motilidade heterogêneo em um curto período de tempo”. Fornece diversos dados em um programa caracterizado por confiabilidade, versatilidade e facilidade de manuseio e configuração.

4.1.6.1 Fluorescência

Após análise do sêmen no programa CASA[®], eram procedidas técnicas de fluorescência para avaliação funcional e morfológica espermática.

A coloração de hidróclorido de clortetraciclina (CTC) é realizada a partir do protocolo baseado na técnica desenvolvida para o Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa. A finalidade dessa coloração é diferenciar espermatozoides capacitados de não capacitados, pois é um quelante de Ca^{+2} , onde a fluorescência indicaria a localização desse íon devido a uma alteração de membrana. Os visualmente uniformes quando observados em microscópio de fluorescência são os não capacitados; nos capacitados é distinguível o acrossoma por estar mais fluorescente que o resto de sua estrutura, naqueles com reação acrossomal aparece um halo com fluorescência mais intensa na base do acrossoma e a cabeça permanecendo de cor mais pálida, assim como também há a possibilidade de aparecerem com as duas últimas características em comum. Na figura 6 são representadas essas características.

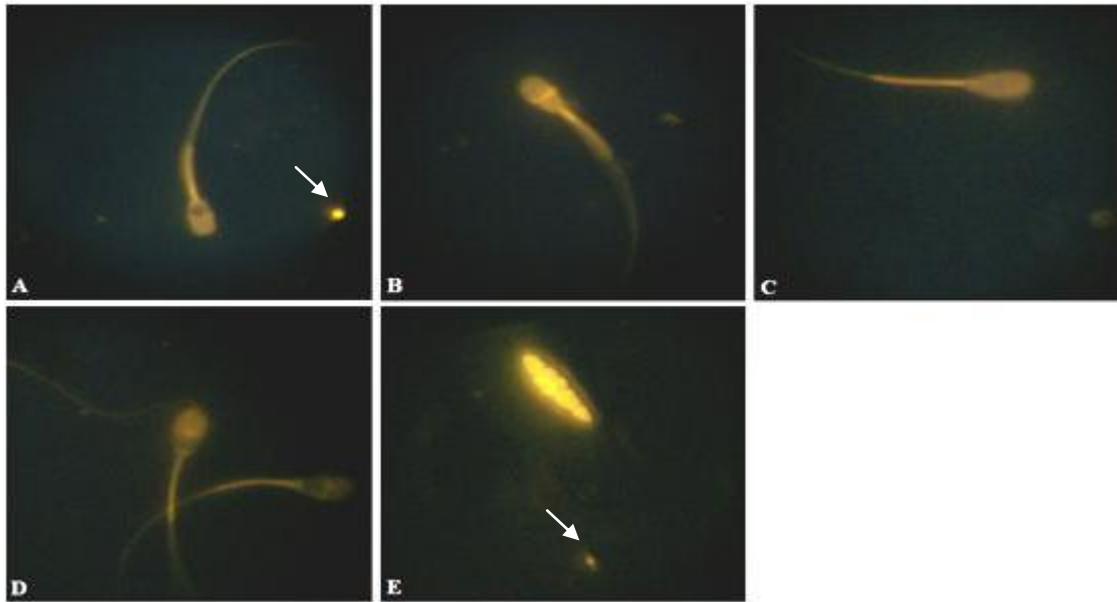


Figura 6. Análise espermática com fluorescência de CTC em aumento de 1000x. A: espermatozoide capacitado e bactéria (seta); B: espermatozoide com reação acrossomal; C: espermatozoide não capacitado; D: espermatozoide central capacitado e com reação acrossomal, na lateral direita com reação acrossomal; E: contaminação por fungo e bactéria (seta).

A leitura das lâminas é feita após o tempo suficiente para completa decantação dos espermatozoides ou *overnight*, o qual é preferível. No entanto, o aparecimento de bactérias e fungos contaminando a amostra pode ocorrer e é demonstrado na figura 6 subitem E.

É efetuada a contagem de 200 espermatozoides, classificando cada um pelas categorias já descritas, é possível avaliar sua qualidade em relação ao animal doador. É desejável que a primeira categoria, ou seja, os de não capacitados, esteja em maior proporção, pois são estes que terão melhores chances de fecundar um ovócito por ganharem sua capacitação no trato reprodutivo feminino, no istmo da tuba uterina (HAFEZ e HAFEZ, 2003), pois conforme Carvalho (2009 apud GADELLA et al., 2001.) “se a reação do acrossoma é iniciada antes da ligação do espermatozoide à ZP, as enzimas são perdidas e o espermatozoide não é capaz de ultrapassar a ZP e de fecundar o ovócito”. A capacitação é fundamental para que ocorra essa ligação a ZPA.

Para confirmação do acrossoma reagido, requer efetuar coloração PNA. Portanto, outra metodologia de mensurar a integridade acrossomal é através do uso de lecitinas conjugadas, que se ligam a glicose, manose, galactose e N-acetilglucosamina ou outros carboidratos específicos de glicoproteínas que estão exclusivamente localizados no acrossoma. O PNA, por exemplo, é a lecitina de amendoim (*peanut agglutinin*), que por sua

vez, tem a competência de avaliar a integridade de acrossoma ligando-se a glicoproteínas da membrana acrossomal externa, fornecendo uma coloração esverdeada quando reagido. O PNA conjugado ao isotocianato de fluoresceína permite a visualização dos espermatozoides, sob microscopia de epifluorescência e de contraste de fase, e conjugado ao iodeto de propídeo a avaliação da integridade de membrana, ao ligar-se no DNA de espermatozoide com membrana lesada/permeável resultando em coloração avermelhada (CARVALHO, 2009). De acordo com Carvalho (2009), são classificados em:

morto com acrossoma íntegro (presença de coloração vermelha na cabeça e ausência de coloração no acrossoma); morto com acrossoma reagido (presença de coloração vermelha na cabeça e verde no acrossoma); vivo com acrossoma íntegro (ausência de coloração na cabeça e acrossoma); vivo com acrossoma reagido (ausência de coloração na cabeça e presença de coloração verde no acrossoma).

4.1.7 Fecundação *in vitro*

Antes, de se iniciar o procedimento, os meios deverão estar previamente preparados.

Primeiramente, se retiram as soluções de *Percoll* 90%, meio de lavagem TALP (CAP), e FEC da câmara fria para o fluxo laminar do Laboratório de Foliculogênese. Nele, são separados três microtubos de 2mL, nos quais serão acrescidos 400µL de *Percoll* 90% (puro) em um; em outro 250µL de *Percoll* 90% mais 250µL de CAP e no último 1000µL de CAP. Do tubo de microcentrífuga contendo as misturas de meios (*Percoll* 45%) serão coletados 400µL e delicadamente depositados sobre o *Percoll* puro. Desta forma, o gradiente de *Percoll* para seleção dos espermatozoides com motilidade e vigor melhores está concluída e será estabilizada a temperatura de 39°C em estufa por 2 horas juntamente ao microtubo contendo CAP, mantendo seus recipientes abertos e em contato com as condições ambientais da estufa.

Em seguida, para uma receita de FEC, o rendimento final é de aproximadamente quatro gotas de 200µL, devendo esta ser multiplicada para obtenção de quantidade de gotas suficientes para comportar cada *pool* de ovócitos. Por exemplo: 200µL servem para banho dos ovócitos MII, com propósito da remoção dos resquícios do meio anterior; mais 200µL para a fecundação *in vitro*.

O FEC é composto de 900µL de FEC (TALP Fert), 40µL de PHE (2mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina e 250mM de epinefrina) e 10µL de heparina, totalizando 950µL. Ou seja, 800µL são destinados aos *pools* e o volume restante (150µL), não utilizado, servirá para suprir a margem de erro da pipetagem e ressuspensão dos espermatozoides no CAP (TALP). De acordo com o volume a ser preparado pode ser acondicionado em tubo cônico de centrifuga de 15mL ou tubo de microcentrifuga. São montadas placas de petri pequenas (50X15) com suas respectivas gotas de meio FEC submersas em óleo mineral e identificadas para estabilização de temperatura e gaseificação na mesma estufa pelo mesmo período de tempo.

A penicilamina, a hipotaurina e epinefrina têm por função agir como antioxidantes, estimular a motilidade espermática e ser uma fonte proteica, garantindo efeitos favoráveis aos resultados (GORDON e LU, 1990). *In vivo*, estão presentes no fluido tubárico a transferrina e albumina. Em contrapartida, a heparina capacita os espermatozoides pela remoção de componentes do plasma seminal da superfície espermática (HAFEZ e HAFEZ, 2003).

O trato reprodutivo feminino é responsável pela capacitação espermática (ALBERTS et al., 2004), processo fundamental para espermatozoide ligar-se a ZP sofrendo alterações funcionais e estruturais, que em conjunto com a reação acrossomal, torna-o capaz de fecundar o ovócito (CARVALHO, 2009). Este fenômeno é disparado pela presença de íons bicarbonato (HCO_3^-) na vagina, os quais ativarão a enzima adenilil ciclase solúvel no citosol do espermatozoide, que, por sua vez, produzirá AMP cíclico, iniciando alterações na composição lipídica e glicoproteica da membrana plasmática, aumentando metabolismo e motilidade espermática e tornando a membrana hiperpolarizada (ALBERTS et al., 2004). Segundo Carvalho, a capacitação consiste em mecanismos que removem ou alteram a estabilidade da membrana plasmática do espermatozoide. Dentre os quais há modificações da fluidez da membrana, do fluxo de íons e pH intracelular. A presença de albumina promove o efluxo de colesterol iniciando a desestabilização da membrana espermática. Por fim, a reação acrossômica é iniciada após a capacitação e a ligação às glicoproteínas específicas da zona pelúcida (HAFEZ e HAFEZ, 2003; CARVALHO, 2009).

Passados as 2 horas para estabilização dos meios, uma palheta de sêmen é descongelada em água a temperatura de 37°C por 20 a 30 segundos. Sua extremidade é cortada invertendo-a na boca de abertura de um tubo de microcentrifuga. Corta-se a outra ponta deixando todo sêmen escorrer para o recipiente. Em seguida, faz-se a avaliação de

5µL quanto aos parâmetros de motilidade e vigor. O sêmen restante é transferido para o gradiente de *Percoll* delicadamente, com ponteira voltada para parede do tubo, resultando em uma solução bifásica, submetido a centrifugação em microcentrífuga a 9000rpm por 5 minutos. Encerrado a centrifugação, o microtubo é observado sob lupa estereoscópica em fluxo laminar para visualizar o pellet formado. O sobrenadante é descartado, recolhendo o pellet, colocando-o no tubo contendo 1mL de CAP. É centrifugado novamente na mesma velocidade e tempo. Nesse ínterim, são retiradas da estufa as placas contendo os ovócitos maturados (expandidos e em meiose II (MII)) para lavagem em 200µL de FEC antes de serem transferidos para a placa FIV. Após a transferência para as gotas, a placa retorna para a estufa. Ao término da centrifugação, retira-se o microtubo com cuidado para não desfazer o pellet, no qual o sobrenadante é descartado. O pellet é ressuspensionado com 50µL de FEC e imediatamente 5µL desse pellet são avaliados em lâmina para motilidade e vigor e na câmara de Neubauer é determinada a concentração. Para contagem de células na câmara de Neubauer, são pipetados 5µL de espermatozoides adicionando em 95µL de água destilada (diluição 1:200) cuja função é espermicida, recolhendo aproximadamente 7µL dessa solução diluída para preencher a câmara.

A partir desses valores, obtém-se a dose inseminante, determinada pela equação:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

Onde:

C1: concentração obtida na câmara de Neubauer

V1: volume da dose inseminante

C2: concentração final

V2: volume final

Retira-se novamente da estufa a placa com ovócitos em MII para adicionar a dose inseminante calculada de forma que a concentração final seja $1,0 \times 10^6$ spz/mL e o volume final 200µL, sendo tudo controlado em lupa. Os espermatozoides são fotossensíveis, desta forma é recomendado colocar o filtro na lupa e o procedimento deve ser o mais breve possível. Por fim, retorna a placa com ovócitos inseminados para estufa sendo este momento considerado o dia 0 ou D0.

Em contraste, em Dublin a seleção espermática é realizada por 60 minutos no procedimento *swim-up* com ulterior lavagem e incubação em meio contendo heparina por 15 minutos. E, durante a FIV, ovócitos MII são parcialmente desnudos das células do *cumulus* por pipetagem e em seguida são lavados em solução de citrato de sódio a 3% para facilitar a exposição aos espermatozoides, sem efeito adverso sobre a FIV e desenvolvimento embrionário inicial. A dose espermática normalmente utilizada é 1 milhão/mL (GORDON e LU, 1990).

Os espermatozoides capacitados ao entrarem em contato com as células do *cumulus* liberam enzimas hidrolíticas permitindo sua passagem e em seguida, ao se ligarem a ZP, liberam hialuronidase (HAFEZ e HAFEZ, 2003; ALBERTS et al., 2004; CARVALHO, 2009) ou arilsulfatase em suínos (HAFEZ e HAFEZ, 2003).

À medida que se aproximam da zona pelúcida, ocorrem dois eventos, a fixação espécie-específica e a penetração pela reação acrossômica. Na fixação, receptores proteicos de ligação na membrana da cabeça do espermatozoide ligam-se a proteína ZP3. Ocorre a abertura nos canais de cálcio para influxo desse íon ao citosol do espermatozoide, o qual age nos fosfolipídios de membrana auxiliando na fusão dos dois gametas. Há trânsito de hidrogênio e sódio para interior da célula pela abertura de canais de Na^+ com posterior alteração de pH; há também a síntese de substâncias fusogênicas e aumento da pressão hidrostática, resultado do influxo de água (HAFEZ e HAFEZ, 2003; ALBERTS et al., 2004; CARVALHO, 2009). Tudo culminando na indução do espermatozoide a sofrer reação acrossômica, liberando seu conteúdo enzimático por exocitose. Enzimas hialuronidase auxiliarão na abertura de túneis através da zona pelúcida, expondo proteínas da superfície do espermatozoide às proteínas da zona pelúcida ZP2 fornecendo maior aderência enquanto ele atravessa a mesma (HAFEZ e HAFEZ, 2003; ALBERTS et al., 2004).

A fim de evitar a polispermia, a despolarização rápida da membrana plasmática advinda do aumento de cálcio e diminuição do sódio intracelular do ovócito é fundamental, no entanto logo sua polarização é restabelecida, sendo necessário um segundo mecanismo mais duradouro. A reação cortical asseguraria o bloqueio da polispermia (ALBERTS et al., 2004).

Concomitante à fusão das membranas das células masculina e feminina, o cálcio citosólico aumenta manifestando-se por oscilações ou ondas, ativando o ovócito, para continuação da meiose e liberação do corpúsculo polar; também liberando o conteúdo dos grânulos corticais por exocitose, incluindo enzimas capazes de hidrolisar parcialmente

a ZP2 e ZP3, tornando endurecido o envoltório extracelular do ovócito (HAFEZ e HAFEZ, 2003; ALBERTS et al., 2004; CARVALHO, 2009). Microvilosidades da superfície ovocitária são agrupadas em torno do espermatozoide potencializando sua aderência à membrana citoplasmática facilitando a penetração. O gameta masculino é absorvido com seu pró-núcleo (n), para subsequente fusão com o pró-núcleo feminino, e suas organelas, como o centríolo, que também são aproveitadas pelo gameta feminino (ALBERTS et al., 2004).

Outro fator capaz de influenciar nas taxas de fecundação são as diferenças no sêmen de diferentes touros e raças, mencionado no trabalho realizado em Dublin e descrito pelo autor Gordon e Lu. (1990).

As lâminas e lamínulas utilizadas nas avaliações espermáticas foram pré-aquecidas a 37°C.

Com objetivo de efetuar o cultivo *in vitro* (CIV) no dia seguinte (18 a 20 horas pós-fecundação), é importante deixar o meio SOF estabilizado em estufa no dia anterior (D0) ou *overnight*.

4.1.8 Cultivo *in vitro*

Passadas as 18 a 20 horas da fecundação, contabilizando como dia 1 (D1), esses possíveis zigotos são transferidos ao meio SOF, cujo protocolo de fabricação está descrito no subitem 4.7.

Esta etapa é crítica devido à grande exigência nutritiva e metabólica, que aumenta relativamente ao número de células embrionárias, isto denota a importância do ovócito estocar energia durante a ovogênese (ASSAF, 2007).

Inicialmente, em fluxo laminar, utilizando a lupa estereoscópica, possíveis zigotos são desprendidos um dos outros com retirada de excesso de células do *cumulus* (CC). Também são banhados em 200µL de meio SOF, com intuito de retirar o meio anterior, e pipetados sucessiva e cuidadosamente com a pipeta de manipulação para remoção de CC e espermatozoides mortos que produziram toxinas às células viáveis. Preparado uma placa de petri (50X15) com 200µL de SOF submersa em óleo mineral e identificada pela data, nome do técnico, etapa (cultivo *in vitro* - CIV) e os diferentes *pools* (grupo controle e grupo(s) a ser(em) avaliado(s), os possíveis zigotos são transferidos e

colocados em estufa a temperatura de 39,1°C, com concentração de CO₂ a 5,0% e O₂ a 10%. As CC restantes, nesse caso, substituem as células de oviduto para cultivo, que serão comentadas posteriormente, reduzindo riscos de contaminação do meio e da incubadora. Essa técnica se diferencia do cultivo *in vivo* e do uso de monocamada celular tubárica por atrasar um dia do desenvolvimento embrionário (GORDON e LU, 1990).

No dia 2 os possíveis zigotos são retirados da estufa e soltos do fundo da placa, para aumentar a área de contato com o meio, incluindo o descarte de CC unidas à placa, e análise do total de número de estruturas, de clivados e de zigotos com mais de quatro células, em lupa.

Nos dias 6, 7 e 8 é avaliada a produção de embriões fornecendo uma previsão das estruturas que vão se desenvolver tendo o cuidado de evitar que fiquem aderidos ao fundo da placa. São observados estágios de desenvolvimento de blastocistos iniciais, blastocistos, blastocistos expandidos, blastocistos em eclosão, blastocistos eclodidos e estruturas degeneradas e não fecundadas. Todos os procedimentos realizados, incluindo os resultados, são anotados em ata de controle.

No D7, caso seja necessário, os embriões são envasados para transferência e no D8 prepara-se os embriões para congelamento e posterior avaliação em PCR para extração de DNA ou RNA.

Uma alternativa, no trabalho realizado em Dublin, Gordon e Lu (1990) relatam zigotos bovinos obtidos *in vitro* foram transferidos para a tuba uterina cirurgicamente ligada de uma ovelha após algumas horas de sua ovulação para o cultivo *in vivo*. Houve discrepância de resultados, dependendo de fatores endógenos do animal e exógenos, como a experiência do técnico, variando a taxa de recuperação de 0 a 100%, além de ser difícil reproduzir essa técnica em escala industrial. Diferente do que ocorre *in vitro*, onde os fatores de interferência são mais controlados podendo produzir embriões em massa. Em contrapartida, centenas de zigotos podem ser introduzidas em uma mesma tuba sem comprometimento da porcentagem de recuperação, como também de propiciar um ambiente muito mais semelhante ao de uma tuba uterina de bovino vivo.

Novamente no trabalho de Gordon e Lu (1990) a presença de uma monocamada de células de tuba uterina de vaca recentemente ovulada, no cultivo *in vitro*, permitiu o desbloqueio de seu estágio de desenvolvimento inicial, entre 8 e 16 células. Também relata que a concentração de soro bovino no meio de cultivo para produção de embrião e aditivos como insulina refletem no desenvolvimento entre os estágios de 48 horas pós-inseminação e mórula/blastocisto.

Pesquisas indicam que a presença de co-cultivo de células somáticas modifica o meio pela secreção de substâncias promotoras do desenvolvimento do embrião, removedoras de impurezas e redutoras de nutrientes em excesso, tornando um ambiente favorável ao crescimento embrionário. Níveis de glicose devem estar reduzidos na maioria das vezes, que são definidas pelo uso dos meios sequenciais. Em contrapartida é exigido níveis maiores quando no período de pós-compactação, desta forma, meios de cultura sequenciais livres de soro trouxeram bons resultados para CIV até a fase de blastocisto (ASSAF, 2007).

4.2 DESNUDAMENTO DE OVÓCITOS

A partir de 24h após início da maturação dos ovócitos em estufa, a placa de MIV é removida para o fluxo laminar para manipulação. Neste momento, os ovócitos são realocados para uma gota de 100µl de hialuronidase por 5 minutos. Essa enzima tem a função de auxiliar na remoção das células do *cumulus* que estão aderidas a zona pelúcida. Porém, somente esse procedimento não é suficiente para completo desnudamento, logo, devem-se mover os ovócitos para uma gota de 200 µl de meio PBS, os quais serão pipetados sucessivamente em pipeta regulada para 70µl com ponteira com a ponta achatada com auxílio de uma pinça. Esse volume marcado na pipeta evita formação de espuma, que atrapalha na visualização dos ovócitos na lupa. Os ovócitos à medida que forem desnudados são removidos para um tubo de microcentrífuga contendo 15µl de PBS. Posteriormente são transferidos para o tubo de fixação.

4.3 FIXAÇÃO DE OVÓCITOS

Os ovócitos contidos no microtubo com 1mL de solução de fixação (3:1 de etanol puro e ácido acético glacial, permanecem no mínimo por 48 horas para completa fixação.

Decorrido o tempo previsto, com pipeta de Pasteur todo conteúdo do microtubo é transferido para uma placa de quatro poços. Os ovócitos são então transferidos para uma

lâmina identificada com o nome do técnico, data, fase e horas de maturação. Esta lâmina deve ter duas linhas de vaselina sólida para evitar que quando for colocada a lamínula esta não rompa os ovócitos. Em uma das extremidades longitudinais da mesma, duas gotas de corante Lacmóide são acrescentadas com auxílio de pipeta de Pasteur. Com auxílio da lupa ao observar a membrana do ovócito se assemelhando a um halo rosado, remove-se o excesso de corante adicionando volume suficiente de solução de fixação no mesmo bordo em que fora aplicado o corante. No bordo oposto, encosta-se um pedaço de papel toalha adjacente à lamínula, que irá absorver o excesso de líquido extravasado, a lâmina torna-se transparente gradativamente. Ao término desse procedimento, selam-se as duas extremidades da lamínula com esmalte, impedindo a evaporação da solução; localizam-se os ovócitos os quais são circulados com caneta própria, preferencialmente no lado contrário da lâmina a qual se encontra a lamínula, impedindo com que esta se mova e esmague a célula.

Ao microscópio de contraste de fase e em aumento de 1000x, observa-se a morfologia nuclear das células. Nos ovócitos em metáfase II, os cromossomos diplóides homólogos são separados, formando a placa metafásica, indicando que o ovócito realizou a maturação nuclear. Por conseguinte, as duas características primordiais para avaliação dessas células, se o procedimento de MIV ocorreu com sucesso é o aparecimento do corpúsculo polar e dos cromossomos condensados separando-se dos seus homólogos.

Nesse mesmo processo, é possível avaliar os ovócitos a 0h, ou seja, ainda em prófase I. As características observáveis são a presença de vesícula germinativa com os cromossomos descondensados, ou seja, não perceptíveis. Algumas vezes, a vesícula não está mais aparente. Este fenômeno é explicado pela retomada da meiose, ocorrendo a quebra da vesícula germinativa com subsequente condensação da cromatina e reorganização dos microtúbulos, formando o fuso metafásico, determinando a primeira divisão meiótica. Os ovócitos continuam o processo de maturação com parada na metáfase II até o momento da fecundação (ASSAF, 2007).

4.4 COLORAÇÃO DE HOECHST

Possui a fórmula (2'-[4-ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride trihydrate) e tem a propriedade de adentrar a membrana

celular se ligando principalmente aos nucleotídeos adenina e timina da molécula de DNA, a qual quando exposta a luz ultravioleta emite fluorescência azul de comprimento de onda de 460-490nm. Desta forma, é possível avaliar o núcleo de células vivas ou fixadas (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2012).

O protocolo utilizado segue com o preparo inicial do marcador fluorescente produzido pela mistura de 1000 μ L de PBS com 10 μ L de corante Hoechst 33342, na concentração de 1 μ g/ml. Essa solução, por ser fotossensível, deverá ser armazenada em microtubo envolto em papel laminado.

4.4.1 Em zigotos:

A coloração de Hoechst 33342 permite avaliar os zigotos pela presença de pronúcleos, verificando a eficácia da fecundação *in vitro*.

Em placa de quatro poços, colocar a solução diluída do corante e adicionar os possíveis zigotos D2 provenientes do cultivo *in vitro*, deixando agir por 5 minutos em ambiente escuro (placa de petri laminada). Com a pipeta de manipulação, transportar os possíveis zigotos para lâmina, cobrindo-os com lamínula para visualização no microscópio de epifluorescência em aumento de 200x, equipado com filtro UV. Esse evento é apresentado na figura 7, destacando em fluorescência azul os pronúcleos masculino e feminino.



Figura 7. Coloração de Hoechst. Fluorescência em aumento de 200x destacando os pronúcleos dos zigotos.

4.4.2 Em embriões:

Se o objetivo for contagem de blastômeros, fazer a coloração de Hoechst 33342 em blastocistos expandidos no sétimo dia pós fecundação. Antes, porém, é fundamental sua mensuração, que será descrito no subitem 4.6. O procedimento de preparo dos embriões é idêntico ao dos zigotos, colocando-os em placa de quatro poços com a solução diluída de corante por 5 minutos em ambiente escuro. Em seguida transportando-os lâmina com posterior visualização no microscópio de epifluorescência em aumento de 200x, equipado com filtro UV, demonstrado na figura 8. Em fluorescência azul, destacam-se os núcleos dos blastômeros, que indiretamente possibilitam a contagem destes.

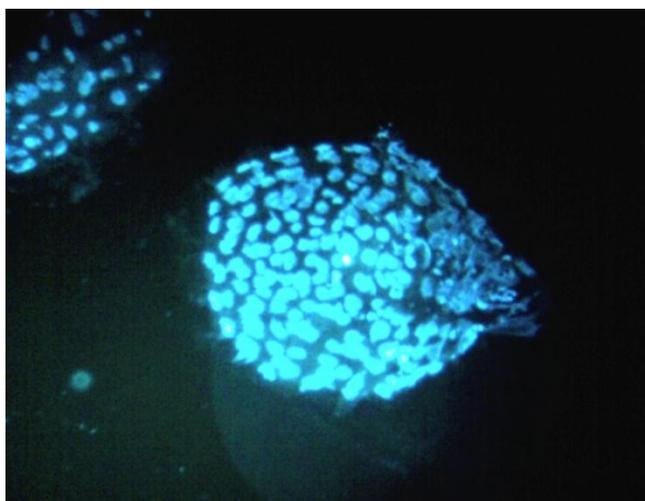


Figura 8. Coloração de Hoechst. Fluorescência em aumento de 200x destacando os núcleos dos blastômeros.

Essa contagem realizada em blastocistos D7 tem o intuito de estabelecer um padrão de crescimento de embrião. Faz-se uma comparação entre a contagem total de blastômeros e a média geralmente obtida para determinado diâmetro do embrião, sugerindo um crescimento melhorado ou não com relação ao tratamento empregado durante o cultivo.

4.5 MENSURAÇÃO DE FOLÍCULOS

Inicialmente, era necessária a dissecação dos folículos a partir da região cortical dos ovários, com uso de bisturi, tesoura ponta romba e pinça. Eram selecionados aqueles que possuíam diâmetro entre 1 a 3mm e 6 a 8mm, mantendo-os em placa aquecida com meio LAV a 36°C. Somente em lente graduada na lupa estereoscópica era possível determinar o tamanho exato das estruturas.

Essa demarcação permite a avaliação da capacidade do ovócito oriundo de folículos de diferentes tamanhos de se desenvolver. A capacidade destes ovócitos é dependente dos transcritos e constituintes maternos estocados na célula. Estes transcritos e constituintes estarão presentes em maiores ou menores proporções variando com o tamanho folicular, pois todas as células possuem aparatos para potencial desenvolvimento (BETTERIDGE, 2003).

Em folículos de 1 a 3mm, o ovócito encontra-se consideravelmente dependente de fatores externos advindos de células somáticas circundantes (CAIXETA et al., 2009), fornecendo taxas significativamente baixas de produção de embriões após maturação e fecundação *in vitro* (GORDON e LU, 1990). O crescimento do ovócito é completo quando o folículo atinge diâmetro de 3mm, o qual será responsivo ao FSH (CAIXETA et al., 2009).

De antemão, ovócitos oriundos de folículos entre 6 e 8mm possuem grande estoque destes fatores obtidos durante a foliculogênese (CAIXETA et al., 2009), tornando-se independentes do ambiente ovariano, propiciando seu crescimento ordenado até a ativação do genoma embrionário. Estes são designados competentes meioticamente (GORDON e LU, 1990) e em desenvolvimento, por terem sido capazes de acumular transcritos específicos inseridos em seus pools de RNAm, mas o mecanismo em si de como se adquire tal designação permanece obscuro (CAIXETA et al., 2009).

4.6 MENSURAÇÃO DE OVÓCITOS E EMBRIÕES

Os ovócitos são mensurados com auxílio de câmera Motic®, que capta exatamente a imagem observada na lupa estereoscópica. Esta câmera possui no seu

software uma ferramenta que mensurará o diâmetro de cada ovócito. Esta técnica é utilizada, pois existe uma relação também com a competência ovocitária (CAIXETA et al., 2009).

O mesmo procedimento se repete com embriões, selecionando os que estiverem apresentando diâmetro maior de 160 μ m na Motic®. O desnudamento desses embriões é semelhante ao descrito no subitem 4.2, contudo realizando processo com pipeta normal esterilizada, sem modificá-la; também não é usado hialuronidase e ter cuidado para proteção de contaminantes externos. Os embriões devem ser manipulados com luvas de procedimento e máscara, pois o destino final deles será o congelamento em microtubo contendo PBS de congelamento para pesquisas posteriores com extração de DNA e RNA.

Se, porventura, o objetivo seja a coloração com meio Hoechst, após desnudamento, transferem-se esses embriões para placa de quatro poços ou microtubo contendo meio LAV, dependendo do número de *pools* utilizados no cultivo *in vitro*. Continuando-se com a metodologia relatada no subitem 4.4.

4.7 PREPARAÇÃO DOS MEIOS E SOLUÇÕES

O meio LAV cuja função é a lavagem das células e facilitar a manipulação, designado também como meio de bancada, é feita pela adição em tubo cônico de 45mL de meio TCM 199 (Sais de Hank's, GIBCO) com Hapes, mais 5mL de soro fetal bovino e 15 μ L de amicacina. Filtrar o meio em filtro millipore de 0,22 μ m. Selar com filme ZAP® e armazenar em temperatura de 4°C. Para uso imediato, estabilizar na estufa por 2 horas a 37°C.

Os protocolos do MIV, FEC e SOF (fluido de oviduto sintético) são meios prontos da marca GIBCO® modificados e antes de utilizá-los, adiciona-se Sulfato de Amicacina objetivando a redução de contaminação externa, na proporção de 15 μ l/50ml de meio.

Pesquisas demonstram que a permanência de células do *cumulus* no meio de maturação, assim como a suplementação hormonal, como gonodotrofinas (FSH ou LH) e estradiol, são pré-requisitos para dar suporte a maturação citoplasmática (GORDON e LU, 1990). Mais especificamente, o FSH atua na maturação das células do *cumulus* e da granulosa (ASSAF, 2007). No meio comercial M-199 é constituído de 20% soro

estrogênico bovino, podendo ser substituído pelo soro fetal bovino. Em geral, proporcionam fonte de esteroides, hormônios peptídeos e fatores de crescimento (GORDONe LU, 1990).

Logo, o meio de maturação utilizado durante o estágio na rotina do LRA I consistiu em meio comercial TCM 199 saís de Earl (GIBCO BRL®) acrescido de 10% de SFB, 24 UI/mL de LH, 10 µg/mL de FSH, 1 µg/mL de L-glutamina e 50 µg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina (CARVALHO, 2009).

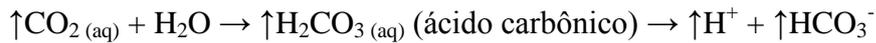
Ao proceder o CIV de embriões, utilizou-se o meio SOF suplementado “com aminoácidos essenciais e não essenciais, 0,34 mM de sodium tri citrato, 2,77 mM myo-inositol e 5% de SFB (SOFaaci)”, semelhante ao utilizado por Carvalho (2009).

A suplementação com substratos energéticos são fundamentais no início do desenvolvimento embrionário, mais especificamente do blastocisto. Piruvato, lactato, citrato de sódio e aminoácidos são exemplos, além de servirem também como reguladores de pH e osmolaridade intracelular, assim como a glicose é requerida nos estágios de mórula e blastocisto, sendo essencial na síntese proteica do blastocisto juntamente com os outros substratos (ASSAF, 2007).

O SFB, no entanto, tem papel crucial no desenvolvimento do embrião como fonte proteica, mostrada sua importância no trabalho de Leivas et al. (2011), em que a sua adição nos meios de cultivo trouxe taxas maiores na produção de blastocistos inclusive nos de qualidade I. Também resultou em melhores taxas de prenhez por COC quando maturados *in vitro*.

Esses meios permanecem armazenados a 4°C e são preparados um por vez, evitando a retirada de vários ao mesmo tempo da geladeira. MIV e SOF podem ser elaborados no dia anterior, somente o FEC recomenda-se preparar no momento de sua utilização. Entretanto, se a fecundação for muito cedo no dia, pode ser feita essa exceção.

As soluções LAV, TALP (*tyrode's, albumin, lactate, pyruvate* – CAP, GE®) e *Percoll* (GIBCO®) manuseadas no LRA I, são adicionadas de substância HEPES como agente tamponante, não havendo necessidade de estabilizar em estufa por duas horas a temperatura de 39°C, com controle de concentração de CO₂ a 5,0%. Em contrapartida, o tampão bicarbonato de sódio (NaHCO₃), presente nos meios MIV, FEC e SOF, requer essa estabilização por no mínimo 2 horas em incubadora para a não ocorrência da alcalinização de pH pela produção de íons H⁺, por meio da interação de condições de temperatura e ar atmosféricos (ASSAF, 2007), indicado pela modificação da coloração rosa para arroxeado e conforme a equação a seguir:



Fonte: ASSAF, (2007) modificado

O CO_2 fornecido pelo ambiente de estufa tenderá a equação para direita, produzindo mais ácido carbônico (ácido fraco), tornando meio estável. Desta forma, o contato com o meio externo promove a dispersão de CO_2 , tendendo a fórmula para esquerda, reduzindo os níveis de H^+ . De acordo com Gomes, Verza e Esteves (2004), o tempo máximo de exposição à atmosfera fora da incubadora é de 2,5 minutos, mesmo estabilizado previamente a níveis elevados de CO_2 (6,0%). Exceder nas concentrações de tampão no meio, acima de 50 mM especificamente, torna-se tóxico às células ou embriões (Assaf, 2007).

Conforme Assaf (2007), a acidez pondera os efeitos do metabolismo celular sobre o meio pela síntese de ácido láctico e pirúvico, podendo baixar o pH para valores inferiores a 7,0.

Mais comumente utilizado é o bicarbonato, devido a seus benefícios nutricionais além de seu potencial tamponante reduzindo o meio ao pH fisiológico de 7,3 a $7,5 \pm 0,1$ (GORDON e LU, 1990 apud ASSAF, 2007). Em contraste, o HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico) não proporciona benefício nutricional, em compensação fornece efeito tamponante suplementar entre pH 7,2 a 7,6 à cultura celular. É ideal em culturas celulares que exijam manipulação por tempo superior exteriormente à incubadora ou estufa (LIFE, 2012).

Para preparação da hialuronidase utilizada no desnudamento adicionar 10mg de hialuronidase a 10mL de meio LAV em tubo de centrífuga e aliquotar em 20 tubos de microcentrífuga 500 μL da solução.

Na receita de PBS modificado, fazem parte NaCl, KCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Na_2POH_4 , KH_2PO_4 , piruvato de sódio, glicose, penicilina G sódica e sulfato de gentamicina. Concentrações e dose não são informadas por informação ser restrita da Embrapa. No PBS para congelar, estão ausentes os sais de cálcio e magnésio no intuito de evitar interferências nas análises moleculares.

A solução para coloração de Lacmóide é produzida pelo acréscimo de 1g de Lacmóide em 45mL de ácido acético e 100mL de água Mili Q. Depois é passado em papel filtro (CARVALHO, 2009).

4.8 OUTRAS TÉCNICAS:

4.8.1 Manipulação hormonal

Conforme já descrito, a necessidade de aumentar a produtividade em épocas de escassez de alimentos ou de grande lucratividade no mercado da carne trouxe na década de 40 os primeiros trabalhos com terapias hormonais (BETTERIDGE, 2003). Esses protocolos são vastamente utilizados na atualidade para aumentar a taxa de prenhez de receptoras pela sincronização e estimular a superovulação nas doadoras, permitindo o aprimoramento das biotécnicas, além de possibilitar um planejamento ao longo do ano da realização das atividades.

Segundo Ferreira (2012), sua aplicação na inseminação artificial em tempo fixo em vacas leiteiras almejava eliminar problemas de detecção de cio ocasionados pela alta temperatura, aumentando as taxas de prenhez, porém não alcançando níveis semelhantes aos períodos mais frescos do ano. A baixa fertilidade nos períodos de calor pode ser justificada pela grande sensibilidade a temperaturas elevadas de ovócitos e embriões em estágio de desenvolvimento inicial.

No campo experimental Sucupira, protocolos de sincronização de cio auxiliam na preparação de receptoras bovinas para transferência de embriões D7 produzidos *in vitro* no LRA I ou no próprio estabelecimento (LRA II). Entretanto, o único protocolo hormonal acompanhado durante a vigência do estágio foi o de superovulação de doadoras.

Era utilizado o protocolo de superovulação semelhante ao realizado por Kohram e Poorhamdollah (2012), sincronizando o cio com uma aplicação de PGF2 α e colocação de implante de progesterona, possibilitando a luteólise de corpos lúteos maduros, porém mantendo o animal em diestro. Entre os dias 8 e 12 pós-sincronização, doses decrescentes de Folltropin® foram administradas duas vezes ao dia (12h de intervalo) intramuscular em 4 dias seguidos: 3,5; 3, 3; 2,5, 2,5; 2, 2; 1,5ml; para estimulação de mais folículos emergirem evitando a dominância de apenas um. Ao fim, era aplicada juntamente com o Folltropin® a prostaglandina para indução da luteólise de qualquer resquício de corpo lúteo do ciclo estral anterior, retirada do dispositivo

intravaginal e era realizada inseminação artificial. Nos dois dias posteriores e consecutivos, IA seria efetuada uma vez ao dia.

4.8.2 Transferência e colheita de embriões

A TE também se tornou uma estratégia de contornar o problema de estresse térmico em bovinos de leite, o qual ocasiona efeito deletério no crescimento folicular com queda de qualidade ovocitária. Portanto, melhora a fertilidade, pela realização de protocolos de superovulação em períodos mais frescos do ano associado à criopreservação de embriões com posterior TE em estações quentes. Serve também para incrementar as taxas de concepção de fêmeas repetidoras de serviço (FERREIRA, 2012).

Antes de iniciar a técnica de inovulação, as vacas receptoras selecionadas e sincronizadas com 7 dias pós estro eram separadas do plantel para posterior contenção em brete. O animal era avaliado para presença de corpo lúteo. Todo o procedimento inicial é similar ao descrito na OPU no subitem 4.1.3.1, do bloqueio anestésico epidural até a higienização da vulva. O inovulador com o embrião protegido pela camisa sanitária era introduzido na vulva até o fundo de saco vaginal. Depois era introduzido o braço pelo reto, posicionado o inovulador na entrada da cérvix, onde era rompida a camisa sanitária, passagem da cérvix e migração para o corno uterino *ipsi* lateral ao CL. A deposição do embrião era o mais próximo possível da junção útero tubárica.

Na coleta de embriões não cirúrgica, após o prévio processo de contenção física e química já descrita, era introduzida no útero por via transcervical uma sonda de Foley de duas vias. Esta era posicionada no corpo do útero, sendo fixada inflando o balão com aproximadamente 15 ml de ar. Após era conectado um equipo em Y, sendo uma das extremidades conectada ao PBS e a outra ao copo coletor com filtro de embriões (WTA). Por gravidade, 1 a 2L da solução de PBS com 5% SFB, (fixada na altura da cabeça do técnico), descia ao útero lavando simultaneamente os dois cornos uterinos. Esse volume era dividido em múltiplas lavagens e a massagem uterina era fundamental para completa drenagem do líquido. Não era permitida que o filtro ficasse completamente vazio, considerando a desidratação da possível presença de embrião.

No término, o filtro era removido do equipo e enviado ao laboratório onde passava por lavagens e o conteúdo vertido em placa de petri (100X20) sob lupa

estereoscópica para a procura dos embriões. Os embriões eram colocados em meio de manutenção, e eram destinados a TE imediata ou a congelação.

5. COMENTÁRIOS SOBRE O ESTÁGIO

Durante o estágio supervisionado, muitas técnicas foram introduzidas, de forma sucinta, devido ao curto tempo disponível: 504 horas em 4 meses. Dessa forma, o relatório de estágio curricular complementa com breves revisões bibliográficas as biotecnologias, enfatizando a PIVE e seu reflexo no mundo, demonstrando graficamente comparações que colocam o Brasil na liderança.

Semanalmente, era realizada uma reunião entre doutores, alunos de doutorado, mestrado e estagiários para o *Journal Club*, na qual foram abordados diversos temas relacionados com a área em questão, seguidos de discussão. Temas estes que também englobavam defesas de teses, planejamento e organização de projetos. Foi considerada uma excelente forma de aprendizado e ampliação de conhecimento nas diferentes áreas que envolvem reprodução, seja genética, molecular, celular ou hormonal, incluindo a manipulação com o animal.

O número limitado de estagiários possibilitou que o aprendizado das técnicas fosse extremamente rápido pelo fato dos materiais, equipamentos e atenção dos instrutores estarem centradas em poucos alunos.

Os laboratórios dispunham de todo o aparato necessário para a elaboração das técnicas, questão essa muito valorizada pelos orientadores responsáveis e considerada fundamental para a prática de experimentos de alta confiabilidade.

Por fim, a equipe de instrutores era composta por orientadores, alunos de doutorado, mestrado e técnicos, sempre disponíveis a responder e solucionar problemas, fator marcante que determinou um estágio de excelente qualidade.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A rotina dos laboratórios de biotecnologias de reprodução animal mencionados é considerada intensa mediante a quantidade de experimentos realizados diariamente. O ponto culminante que determina a prática das biotécnicas com qualidade é a agilidade e o cuidado durante o manuseio dos equipamentos, principalmente na PIVE.

A Embrapa é exemplar nas suas linhas de pesquisa, mantendo um alto nível de confiabilidade, sendo referência internacional e colaborando para que o Brasil mantenha a liderança frente aos países produtores de embrião *in vitro*.

Para tanto, o LRA I e o LRA II do Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem, para manutenção da qualidade, possuem diversos pontos de controle higiênico e sanitário ao definir o destino apropriado para cada material e equipamento, logo, tornando-se fundamental a obediência às regras dos laboratórios.

Na medida do possível foram expostos os protocolos utilizados nas biotécnicas portanto, sem prejudicar a autoria dos experimentos. Enfim, procurou-se ao máximo explicar detalhadamente cada técnica, enfatizando a PIVE, para a qual fora realizada uma revisão bibliográfica.

Por fim, as fotos presentes no artigo foram de autoria própria, procurando-se selecionar as de melhor definição, angulação e qualidade, permitindo ao leitor visualizá-las e compreender melhor as técnicas e práticas do estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1142-1155p.
- ANTUNES, G.; MARQUES, A.; SANTOS, P.; CHAVEIRO, A.; SILVA, F. M. **Atlas do Ovócito e do Embrião Bovino: breves noções de morfologia e endocrinologia**. 1. ed. S. João do Estoril-Portugal: Príncípia, 2008.
- ASSAF, S. S. **Produção *in vitro* de embriões bovinos cultivados em duas atmosferas gasosas utilizando diferentes sistemas de tamponamento**. Tese

- (doutorado) – Univerdidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.
- BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S. **Fisiopatologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas.** Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.205-211, abr./jun. 2007.
- BELTRAME, R. T.; QUIRINO, C. R.; BARIONI, L. G. **Estudo da evolução das biotécnicas de transferência de embriões e fertilização in vitro na raça Nelore no Brasil.** B. Indústr. anim., N. Odessa, v.67, n.1, p.01-08, 2010.
- BESSA, I. R. **Perfil da expressão de genes candidatos para aquisição da competência durante o crescimento ovocitário em bovinos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 71p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Animais).
- BETTERIDGE, K. J. **A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques.** Animal Reproduction Science, v. 79, p.203–244, 2003.
- CAIXETA, E. S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M. M.; JUNIOR, J. B.; DODE, M. A. N. **Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence.** Reproduction, Fertility and Development, v. 21, p. 655–664, 2009.
- CARVALHO, J. O. N. **Avaliação da qualidade do espermatozoide bovino criopreservado após sexagem por citometria de fluxo e sua utilização na produção in vitro de embriões.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 91p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Animais).
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2. ed. Minas Gerais: CBRA, 1998.
- EMBRAPA. Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Quem somos.** 2011. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/#>>. Acesso em: 06 de março de 2012.
- FERREIRA, R. M. **Por que os rebanhos de alta produção leiteira tem baixa eficiência reprodutiva?** Rev. Oembrião, ano xvi, ed. 50, 1º semestre, 2012.
- GOMES, A. P.; VERZA, S. J.; ESTEVES, S. **Estabilidade dos sistemas tampão bicarbonato e HEPES de vários meios de cultura comerciais: efeitos da**

- concentração de CO₂ e do equipamento.** VII Congresso Brasileiro de Reprodução Assistida, Belo Horizonte, 2004. Disponível em: <http://www.androfert.com.br/site/documento_40_0__estabilidade-dos-sistemas-tampao-bicarbonato-e-hepes-de-varios-meios-de-cultura-comerciais:-efeitos-da-concentracao-de-co2-e-do-equipamento.-trabalho-apresentado-no-viii-congresso-brasileiro-de-reproducao-assistida,-belo-horizonte,-agosto-2004.-.html>. Acesso em 08 de abril de 2012.
- GONCALVES, P. B. D. **Fisiologia do Ciclo Estral.** Santa Maria, 1999. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/71149148/Fisiologia-Do-Ciclo-Estral>>. Acesso em: 30 de abril de 2012.
- GORDON, I.; LU, K. H. **Production of embryos in vitro and its impact on livestock production.** Dublin: University College Dublin, v. 33, n.1, p.77-87, jan. 1990.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal.** 7. ed. Barueri: Manole, 2003.
- KOHRAM, H.; POORHAMDOLLAH, M. **Relationships between the ovarian status and superovulatory responses in dairy cattle.** Animal Reproduction Science, v.131, p. 123-128, 2012.
- LEIVAS, F. G; BRUM, D. S.; FIALHO, S. S.; SALIBA, W. P.; ALVIM, M. T. T.; BERNARDI, M. L.; RUBIN, M. I. B.; SILVA, C. A. M. **Fetal Calf Serum enhances *in vitro* production of *Bos taurus indicus* embryos.** Theriogenology v.75, p. 429–433, 2011.
- LIFE Technologies. Cell Culture Reagents: **HEPES.** 2012. Disponível em: <<https://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Culture/Mammalian-Cell-Culture/reagents/hepes.html>>. Acesso em: 08 de abril de 2012.
- MATOS, D. L.; ARAÚJO, A. A.; ROBERTO, I. G.; TONIOLLI, R. **Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura.** Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v. 32, n.4, p.225-232, out./dez. 2008.
- PONTES, J. H. F.; STERZA, F. A. M.; BASSO, A. C.; FERREIRA, C. R.; SANCHES, B. V.; RUBIN, K. C. P.; SENEDA, M. M. **Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors.** Theriogenology, v. 75, p. 1640–1646, 2011.

STROUD, B. IETS 2011 **Statistics and Data Retrieval Committee Report**: The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. Disponível em: <<http://www.iets.org/pdf/December2011.pdf>>. Acesso em: 9 de maio de 2012.

THERMO FISHER SCIENTIFIC (EUA) (Org.). **Hoechst 33342**: Instructions. Disponível em: <<http://www.piercenet.com/instructions/2162245.pdf>>. Acesso em: 29 de maio de 2012.

ZAP VCI. **Embalagens Protetoras**. Disponível em: <<http://zapvci.com.br>>. Acesso em: 10 de março de 2012.