



---

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

---

**LUCIANA MAYER KLÜPPEL**

**UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SORO FETAL BOVINO (SFB)  
NOS MEIOS DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS E  
AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E DIMINUIÇÃO DE CUSTOS OPERACIONAIS**

**Monografia de conclusão do Curso de  
Medicina Veterinária apresentada à Faculdade  
de Agronomia e Medicina Veterinária da  
Universidade de Brasília.**

Brasília- DF  
Setembro, 2012



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

LUCIANA MAYER KLÜPPEL

UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SORO FETAL BOVINO (SFB)  
NOS MEIOS DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS E  
AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E DIMINUIÇÃO DE CUSTOS OPERACIONAIS

Monografia de conclusão do Curso de  
Medicina Veterinária apresentada à  
Faculdade de Agronomia e Medicina  
Veterinária da Universidade de Brasília.

Orientador  
Prof. Dr. Ivo Pivato

Brasília- DF  
Setembro, 2012

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

KLÜPPEL, Luciana Mayer.

Utilização de diferentes concentrações de soro fetal bovino (SFB) nos meios de cultivo para produção *in vitro* de embriões bovinos e avaliação da viabilidade e diminuição de custos operacionais. Orientação do Prof. Dr. Ivo Pivato, Brasília-DF, Universidade de Brasília.

75 p. : il.

Monografia – Universidade de Brasília – UnB /Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2012.

1.Bovinocultura 2.Biotécnicas da reprodução animal 3.Produção *in vitro* de embriões 4.Meios de cultivo; I. Pivato, I. II. Título.

Cessão de direitos

Nome do autor: Luciana Mayer Klüppel.

Título da Monografia de Conclusão de Curso:

Utilização de diferentes concentrações de soro fetal bovino (SFB) nos meios de cultivo para produção *in vitro* e avaliação da viabilidade e diminuição de custos operacionais

Ano: 2012.

Documento formal, concedendo à Universidade de Brasília a permissão para reprodução de cópias desta monografia e para empréstimos ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos. O autor reserva para si outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são permitidas desde que citada a fonte.

---

Luciana Mayer Klüppel

027.432.861-56

Altiplano Leste, Rua Sítio da Forquilha ch. 24 - Lago Sul

71680-599 Brasília-DF/Brasil (+5561) 91647641 lucianakluppel@gmail.com

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: KLÜPPEL, Luciana Mayer

Título: Utilização de diferentes concentrações de soro fetal bovino (SFB) nos meios de cultivo para produção *in vitro* de embriões e avaliação da viabilidade e diminuição de custos operacionais.

Ano: 2012.

Monografia de conclusão do Curso de Medicina Veterinária apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ivo Pivato (ORIENTADOR)

Instituição: Universidade de Brasília - UnB

Julgamento: Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira (MEMBRO EFETIVO)

Instituição: Universidade de Brasília - UnB

Julgamento: Assinatura: \_\_\_\_\_

Dr. Carlos Frederico Martins - Pesquisador (EXAMINADOR EXTERNO)

Instituição: EMBRAPA CERRADOS

Julgamento: Assinatura: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer àqueles que desde o início me incentivaram a ingressar na carreira veterinária, que me proporcionam os alicerces familiares e de caráter, e que acreditam em mim. Obrigada aos meus pais.

Em especial agradeço aos meus irmãos Érika e Leonardo, que sempre estiveram presentes em minha vida e que diariamente me instigam a atingir o que parece intangível, e a perseguir o incessável conhecimento.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ivo Pivato, agradeço pela maestria, estímulo em busca da excelência, pelos conhecimentos, amizade, e por me fazer acreditar em meu potencial. Muito obrigada.

Ao Dr. Carlos Frederico Martins, agradeço pela oportunidade em acompanhar renomado pesquisador da área de Reprodução animal, pela orientação durante os ensaios e pela experiência em trabalhar no laboratório de biotecnologia animal.

Aos colegas de curso, amigos, e a todo quadro de funcionários do CTZL. Obrigada pelos conselhos, companheirismo, e persistência nos trabalhos que me ajudaram a tornar um sonho realidade.

Ao meu querido amigo Jerônimo Fortes agradeço pelo incessável apoio, por nossas conversas e por sempre me dar esperanças de que podemos fazer a diferença.

## RESUMO

KLÜPPEL, L. M. Utilização de diferentes concentrações de soro fetal bovino (SFB) nos meios de cultivo para produção *in vitro* de embriões bovinos e avaliação da viabilidade e diminuição de custos operacionais./ (Utilization of different concentrations of fetal bovine serum (FBS) in culture medium for *in vitro* embryo production to assess the viability and decrease operating costs). 2012. 75p. (Conclusão do curso de Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma técnica que viabiliza o aumento da eficiência reprodutiva de um rebanho, além de permitir a comercialização de embriões com qualidade. Atualmente a PIV utiliza altas concentrações de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultivo. A presença dos ácidos graxos provenientes do SFB está relacionado com um maior acúmulo de lipídeos no interior dos embriões interferindo no processo e eficiência da criopreservação. Além do mais, o custo final diminui o benefício econômico da técnica. O presente trabalho consiste em duas etapas. A primeira etapa envolve a revisão de literatura acerca do tema produção *in vitro* de embriões bovinos. Na segunda etapa foi realizado estudo, durante o estágio curricular, no qual foram testados diferentes concentrações de SFB (5%, 2,5% e 0%) nos meios de cultivo e realizadas análises da taxa de reexpansão e eclosão dos embriões descongelados. O resultado, apesar de não conclusivo, dá uma direção para futuros estudos que visem diminuir as concentrações de SFB no meio de cultivo.

*Palavras-chave:* Bovinocultura, biotécnicas da reprodução, meios de cultivo, relação custo benefício.

## ABSTRACT

KLÜPPEL, L. M. In vitro embryo production using different concentrations of fetal bovine serum (FBS) in culture medium to assess the viability and decrease operating costs. 2012. 75p.

The *in vitro* embryo production (IVP) is a technique that enables increasing reproductive efficiency in a herd, besides allows the commercialization of high quality embryo. Currently the IVP uses high concentrations of fetal bovine serum (FBS) in the culture medium. The presence of fatty acids derived from FBS is related to an increased accumulation of inner fats inside the cells interfering in embryos cryopreservation efficiency. Moreover, the final cost decreases the economic benefit of the technique. This work consists of two steps. The first step involves the literature review of in vitro production of bovine embryos. In the second step a study was conducted during the traineeship, in which were tested different concentrations of FBS (5%, 2.5% and 0%) in the culture medium and then analyzed the reexpansion and hatching rates of thawed embryos. The result, while not conclusive, provides a direction for future studies aimed at lowering concentrations of FBS in the culture medium.

*Keywords:* Cattle, biotechnology of reproduction, culture medium, cost benefit.

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

**Tabela 01:** Efeito das diferentes fontes de albumina adicionadas ao meio durante a etapa de maturação *in vitro* dos oócitos bovinos.....19

**Tabela 02:** N° e estágio nuclear dos oócitos obtidos de diferentes tamanhos de folículos após MIV por 24h, em vacas Nelore.....38

**Tabela 03:** N° de blastocistos sobreviventes e reincubados pós delipidização e blastocistos controles criopreservados.....54

### ESTÁGIO CURRICULAR

**Tabela 04:** Resultados dos ensaios realizados para avaliação da formação de embriões com diferentes concentrações de SFB no meio de CIV.....62



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

**Figura 01:** Efeitos da irradiação de micro-ondas em quatro colônias isoladas da clínica microbiológica.....17

**Figura 02:** Graus dos oócitos.....23

**Figura 03:** Fotomicrografia de mórulas e embriões compactos em diferentes graus de qualidade.....43

### ESTÁGIO CURRICULAR

**Figura 04:** Mórula inicial, blastocisto inicial e blastocisto.....61

**Figura 05:** Blastocistos expandidos.....61

## LISTA DE ABREVIATURAS

AF	ASPIRAÇÃO FOLICULAR
AOF	TESTE DE LARANJA-ACRIDINA
AT	AZUL DE TOLUIDINA
ATP	ADENOSINA TRIFOSTATO
BSA	ALBUMINA SÉRICA BOVINA
CASA	ANÁLISE COMPUTADOR ASSISTIDA DO SÊMEN
CBRA	COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL
	DISPOSITIVO DE CONTROLE DE LIBERAÇÃO INTERNA DO FÁRMACO
CIDR	
CIV	CULTIVO IN VITRO
CL	CORPO LÚTEO
COC	COMPLEXO CUMULUS OVÓCITO
DMSO	DIMETIL SULFÓXIDO
D <sub>n</sub>	DIA <sub>n</sub> (2; 5; 7; 8; 9, etc)
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
E/N	EOSINA NIGROSINA
FDA	DIACETATO DE FLUORESCEÍNA
FEC	MEIO DE FECUNDAÇÃO
FIV	FERTILIZAÇÃO IN VITRO
FSH	HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE
GMP	GLASS MICROPIPETE
HACCP	ANÁLISE DE PERIGOS E PONTOS CRÍTICOS DE CONTROLE
HECM-6	MEIO DE CULTIVO EMBRIONÁRIO DE HAMSTER
HP4	ALTA DOSE DE PROGESTERONA
ICM	MASSA CELULAR INTERNA
	SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA
IETS	
IGF-I	FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA
IP3	INOSITOL
LH	HORMÔNIO LUTEINIZANTE
LP4	DOSE INTERMEDIÁRIA DE PROGESTERONA
MII	METÁFASE II
MIV	MATURAÇÃO IN VITRO
MPF	FATOR PROMOTOR DA MATURAÇÃO
MT	MEIO DE TRANSPORTE
NEEAS	AMINOÁCIDOS NÃO ESSENCIAIS
OIE	ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL
OMS	ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE
OPS	OPEN PULLED STRAW
OPU	OVUM PICK-UP / ASPIRAÇÃO IN VIVO
PBS	SALINA FOSFATADA
PHE	PENICILAMINA HIPOTÁURINA EPINEFRINA
PIB	PRODUTO INTERNO BRUTO
PIV	PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES
POP	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO
PVA	ÁLCOOL POLIVINÍLICO
PVP	POLIVINIL PIRROLIDONA

r BST	SOMATOTROFINA BOVINA RECOMBINANTE
SCSA	SPERM CROMATIN STRUCTURE ASSAY
SFB	SORO FETAL BOVINO
SOF	FLUÍDO SINTÉTICO DO OVIDUTO
SYBR-14	MARCADOR FLUOROCROMO
TALP	TYRODE'S ALBUMINA LACTATO PIRUVATO
TCM 199	MEIO DE CULTIVO TECIDUAL 199
TE	TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES
TEc	TROFOECTODERMA
TUNEL	TERMINAL DEOXINUCLUOTIDIL TRANSFERASE u DP MEDIADA
VG	VESÍCULA GERMINATIVA
VLP4	BAIXA DOSE DE PROGESTERONA
ZP	ZONA PELÚCIDA

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1 Instalações e procedimentos operacionais padrão.....	15
2.2 Lavagem e esterilização dos materiais.....	16
2.3 Preparo dos meios.....	18
2.4 Aspiração folicular e seleção dos ovócitos.....	21
2.5 Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	26
2.6 Escolha e preparo do sêmen.....	29
2.7 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	35
2.8 Análise da taxa de clivagem.....	36
2.9 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	38
2.10 Destino dos embriões produzidos.....	41
2.10.1 Transferência de embriões.....	44
2.10.2 Congelamento de embriões.....	48
<b>3. ESTÁGIO CURRICULAR</b> .....	55
<b>4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b> .....	66
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	67

## 1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma técnica que visa aumentar a eficiência reprodutiva de um rebanho sem comprometer a vida produtiva da fêmea. A PIV viabiliza o aumento do número de embriões produzidos com qualidade quando combinada a outras tecnologias como o controle da função ovariana, o acompanhamento do desenvolvimento e o crescimento dos folículos, provando ser um método de grande valor econômico e científico (BOUSQUET et al., 1999).

A PIV apresenta diversas vantagens frente à produção tradicional. Por ser um método menos oneroso que permite a produção de um maior número de proles por doadora e pela própria técnica viabilizar a avaliação e manipulação dos embriões durante o estágio de desenvolvimento, a PIV teve seu rápido crescimento alavancado nos últimos anos (REICHENBACH et al., 1992).

O Brasil é responsável por um terço da produção mundial de embriões bovinos. E em relação à biotecnologia da PIV, o país se classifica próximo ao topo do ranking dos maiores produtores mundiais, segundo dados obtidos na 42ª edição do jornal O EMBRIÃO, devido principalmente a características intrínsecas favoráveis do clima e rebanho nacionais (SBTE, 2009).

Por trás de uma posição significativa no mercado mundial de embriões, o país que apresenta 22,3% de seu produto interno bruto (PIB) correspondente ao agronegócio e destes 29,6% só no setor pecuário, revelando ter um importante segmento que se consolida no âmbito das pesquisas de melhoramento genético e reprodução animal (MAPA, 2012).

Segundo Neves et al. (2010) o Brasil atualmente lidera a produção mundial de carne bovina, seguido da segunda posição na produção de aves e em quarta em relação à produção de suínos. De acordo com dados do IBGE, o rebanho nacional produziu somente no primeiro trimestre do ano de 2012, 114.455.440 litros de leite e 1.680.976 toneladas de carne bovina, dados esses oriundos somente de estabelecimentos que estão sob inspeção federal, estadual ou municipal (IBGE, 2012).

Em 2010 o Brasil apresentou um efetivo do rebanho bovino de 209.541.109 de cabeças registradas no censo do IBGE, e somente o Distrito Federal, incluindo as meso e

microrregiões, é representado por 100.600 animais (IBGE, 2012).

Com a geografia favorável a expansão do setor e clima com características bem delimitadas durante todo ano, o DF e as regiões de transição com o Estado de Goiás mostram ser um alvo de impacto para utilização da transferência de embriões (TE) e da PIV. Uma vez instaurado o correto manejo dos animais inseridos no programa, os custos a médio e longo prazos são menores que os obtidos com a pecuária extensiva.

Levando em consideração o censo pecuário realizado em 2006 pelo IBGE somente cerca de 150 mil animais foram beneficiados com a biotécnica da TE em 2005 segundo dados da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) (IETS, 2005).

Contraposto ao cenário de 2006 e objetivando a melhor utilização das biotécnicas reprodutivas, o desenvolvimento de protocolos laboratoriais mais efetivos e com menores custos faz-se necessário visando maximizar a utilização da área destinada à pecuária e chegar ao efetivo de um bezerro/vaca/ano.

Em 2010 houve um aumento de 19,7% na produção *in vitro* mundial de embriões quando comparada a marca de 377.000 obtida em 2009. Segundo dados estatísticos da IETS a América do Sul, em destaque o Brasil, lidera o campo da produção *in vitro* e de transferência de embriões mundial (IETS, 2011).

Com projeções de aumentar a produção nacional para que em 2020 possamos liderar o fornecimento mundial de carnes atingindo 44,5% do mercado mundial (MAPA, 2010) e aumentar a expressividade do país em relação à exportação de leite e seus subprodutos, as biotécnicas avançadas da reprodução (tais como a TE e a PIV) crescem e aperfeiçoam-se anualmente com a injeção de capitais e outras formas de investimento nos alicerces da pesquisa agropecuária.

Focando uma análise da diminuição de custos foi proposto o estudo do protocolo de produção de embriões *in vitro* utilizando concentrações decrescentes (5%, 2,5%, 0%) de soro fetal bovino adicionadas ao meio SOF final.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Instalações e procedimentos operacionais padrão

Determinar e extrapolar o conceito de HACCP (*hazard analysis and critical control points/ análise de perigos e pontos críticos de controle*) para o sistema de gestão laboratorial faz-se necessário, uma vez que a análise prévia dos riscos e pontos críticos de controle nas etapas e procedimentos realizados durante a PIV diminui algumas das variáveis responsáveis pelas taxas de insucesso da pesquisa.

A área do laboratório e as boas práticas de conduta fornecem ferramentas que auxiliam no sucesso do estudo. Tanto a escolha dos materiais adequados, procedimentos operacionais de lavagem e esterilização, quanto à determinação do quadro de funcionários e colaboradores que participarão da pesquisa são elementos-chave para geração de dados conclusivos e consistentes à proposição do estudo (GIANAROLI et al., 2000).

O propósito da adoção de medidas protetoras é assegurar as condições de assepsia para os gametas e embriões, e proteger o manipulador e técnico laboratorista durante o exercício da profissão (GIANAROLI et al., 2000). Há indicação do uso vestimentas específicas em cada área, luvas descartáveis sem pó, máscaras e óculos para diminuição dos riscos de contaminação com materiais potencialmente infectados dado que a origem dos ovários é a de animais provenientes de abatedouros-frigoríficos.

Por trabalhar com materiais de risco químico (corantes com potencial teratogênico, ácidos e bases fracas, etc.) e biológico (fluídos seminal e folicular, sangue, hormônios, materiais com risco de contaminação microbiológica, etc.), a utilização de equipamentos de proteção individual e higienização prévia da aparelhagem e sala devem responder a rotina diária da equipe.

As salas devem ser subdividas de acordo com cada procedimento realizado, sendo de grande importância a separação física das áreas de lavagem, aspiração e manipulação dos embriões. Certos procedimentos envolvem o uso de capelas, fluxos-laminares e incubadoras exclusivas.

As incubadoras devem estar dispostas em uma sala com baixo fluxo de pessoas e

próximas de pelo menos dois cilindros de gás CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub> de uso contínuo e, em outro ambiente separado mais dois cilindros de estoque no caso de alguma emergência (GIANAROLI et al., 2000).

É aconselhável o uso de geradores, uma vez que a privação de CO<sub>2</sub> ou da fonte de calor que leva ao estresse metabólico do embrião tem consequências diretas na qualidade e viabilidade do mesmo. Da mesma maneira, a monitoração semanal das incubadoras deve ser realizada a fim de evitar os efeitos adversos de aumento de temperatura que comprometem o desenvolvimento dos embriões principalmente nos estágios iniciais até D8 (EALY et al., 1993).

Todos os protocolos operacionais devem estar devidamente documentados através de atas que são preenchidas diuturnamente pós-finalização de cada ensaio e através de procedimentos operacionais padrão (POPs) que serão consultados rotineiramente em caso de dúvidas ou para atualização e reposição dos estoques de meios. O controle dos reagentes, calibração e controle de qualidade dos materiais devem ser realizados frequentemente (GIANAROLI et al., 2000).

Todos os documentos são datados, assinados e mantidos com cópia digital para rastreabilidade dos mesmos facilitando a emissão de laudos e resultados.

## **2.2 Lavagem e esterilização dos materiais**

Previamente a limpeza dos materiais é necessária a remoção física de partículas e restos de materiais químicos ou orgânicos que possam comprometer a atividade dos detergentes e germicidas (OMS, 2004).

O enxágue dos materiais deve ser realizado com água corrente e por último submergi-los em banhos consecutivos de água destilada de forma que qualquer resquício de sujidades e detergentes fique no banho de solução hipotônica, através do fenômeno do gradiente de concentração.

Anteriormente ao processo de esterilização, todos os materiais devem ser submetidos à secagem na estufa a 50°C e retirados somente após a completa evaporação das gotículas de água resultantes da lavagem.

A esterilização dos materiais é feita de acordo com o componente principal do



utensílio onde vidros e materiais em aço inoxidável são submetidos à esterilização por calor úmido (autoclave) e os materiais de plástico ou os que não possam ser levados à autoclave são sujeitos ao processo de esterilização por microondas.

Foram realizados, por Bush (1975), experimentos qualitativos para descontaminação de meios de laboratórios via emissão de irradiação de micro-ondas por uso do aparelho forno microondas. Em sua pesquisa foi confirmada a eficiência do procedimento para esterilização dos meios utilizados para diagnóstico clínico microbiológico laboratorial.

Latimer e Matse em 1977 avaliaram a eficácia da descontaminação bacteriana via irradiação do forno microondas em 2,450MHz de frequência, na rotina do laboratório de microbiologia clínica e atestaram a eficiência do procedimento (figura 01).

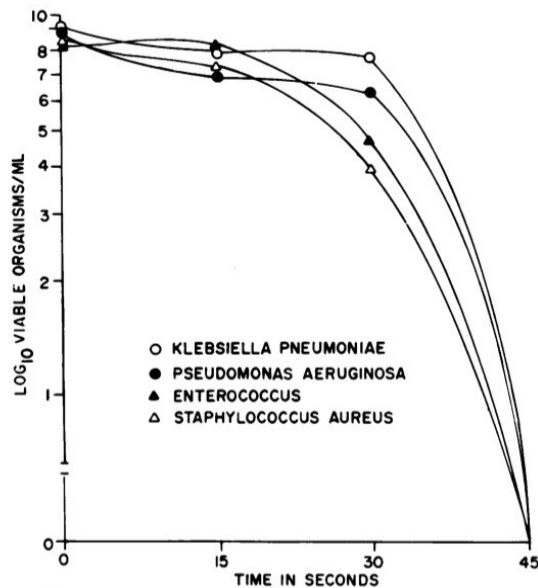


Figura 01.- Efeitos da irradiação de micro-ondas em quatro colônias isoladas da clínica microbiológica.

*Adaptado de Latimer e Matisen, 1977.*

O etanol (álcool etílico,  $C_2H_5OH$ ) quando utilizado em concentração próxima a 70% (v/v) tem sua eficácia comprovada para a desinfecção de materiais contra bactérias vegetativas, fungos e alguns vírus encapsulados, e pouca ou nenhuma eficácia contra esporos, segundo o manual de segurança laboratorial. Dessa forma recomenda-se a utilização de soluções que contenham mais de um agente desinfetante a fim de aumentar o poder de desinfecção e diminuir a margem de grupos microbiológicos não afetados (OMS, 2004).

Além disso, o álcool tem a vantagem de não deixar resíduos em utensílios ou

equipamentos higienizados com o produto, diminuindo as situações de inutilização de determinada ferramenta por apresentar corrosão ou desgaste excessivo da superfície em contato com os meios.

### 2.3 Preparo dos meios

Na década de 90 foi identificado no fluido folicular aspirado de folículos individuais de bovinos, diversos fatores de crescimento intrafoliculares tais como inibinas, ativinas e fator de crescimento semelhante à insulina, que modificam a ação das gonadotrofinas e por ação endócrina, parácrina ou autócrina estimulam o crescimento e a diferenciação folicular (IRELAND et al., 2000). Por isso alguns protocolos visam à adição de macromoléculas e meios que mimetizem os fatores de crescimento e outros componentes sabidamente isolados do fluido folicular das doadoras.

Como a competência do desenvolvimento de embriões bovinos a partir de oócitos maturados *in vitro* é limitada, os componentes e meios ditos indefinidos devem ser eliminados das condições de cultivo (ALI e SIRARD, 2002). Segundo Machado (2009) para a etapa de MIV dos ovócitos bovinos o meio de cultivo tecidual 199 (TCM 199) com adição de sais de EARLE'S é mais comumente utilizado.

Para análise da influência do sistema *in vitro* no desenvolvimento fetal e de sobrevivência embrionária, Farin et al (2001) cultivaram embriões bovinos no estágio de oito a dezesseis células com o meio TCM 199 suplementado com componentes definidos (ao exemplo dos hormônios) e indefinidos (como o soro fetal bovino, SFB). Apesar das condições de cultivo ter alta eficiência investigadores desenvolveram um novo meio semi-definido contendo modificações no SOF (fluido sintético do oviduto) e no meio totalmente definido no qual a BSA (Albumina Sérica Bovina) componente do SOF foi substituído pela PVP (polivinil pirrolidona) (FARIN et al., 2001).

Para a maturação *in vitro* realizada por Bermejo-Álvarez et al. (2008), os COCs (complexos cumulus ovócito) são maturados em grupos de cinquenta, em 50µL de meio TCM-199 suplementado com 10% de SFB (v/v) e 10ng/mL de fator de crescimento epidermal por 24h sob condições de 39°C, 5% CO<sub>2</sub> e atmosfera com a máxima umidade do sistema.

Quando avaliado isoladamente, o PVP-40 adicionado ao meio MIV aumentou a produção de embriões em estágio de mórula e blastocistos, concluindo o raciocínio dos pesquisadores de que o meio SOF sozinho pode promover o suporte necessário para a maturação dos oócitos mas para aumentar a proporção de mórulas e blastocistos produzidos o PVP-40 pode ser usado como suplemento ao meio SOF (ALI e SIRARD, 2002).

Segundo Ali e Sirard (2002), a adição da albumina sérica bovina ao meio SOF respondeu com um atraso no tempo de maturação nuclear quando comparado ao meio MIV adicionado PVP-40 (polivinil pirrolidona), ou ao meio SOF puro. No mesmo trabalho foi relatado que a adição de diferentes concentrações de BSA, SFB, ou PVA (álcool polivinílico) durante a etapa de maturação *in vitro* não trouxe benefícios à capacidade de desenvolvimento dos oócitos quando comparados àqueles maturados somente em meio SOF. De fato, a percentagem de embriões que alcançaram os estágios de mórula e blastocistos foi menor em alguns casos mas a taxa de clivagem não apresentou diferenças significativas nos diferentes tratamentos (tabela 01).

**TABELA 01. EFEITO DAS DIFERENTES FONTES DE ALBUMINA ADICIONADAS AO MEIO DURANTE A ETAPA DE MATURAÇÃO *IN VITRO* DOS OÓCITOS BOVINOS.**

<b>Tratamento</b>	<b>Nº de oócitos</b>	<b>Clivagem (%)</b>	<b>Mórulas e Blastocistos (%)</b>
<b>SOF</b>	65	71 ± 0.8a	32.3 ± 2.3a
<b>SOF + BSA-V não purificada (8 mg/ml)</b>	70	70 ± 2.6a	18.1 ± 1.2b
<b>SOF + BSA-FAF (livre de ácido graxo, 8 mg/ml)</b>	67	70 ± 0.0a	26.6 ± 2.7a
<b>SOF + BSA (purificada, 8 mg/ml)</b>	63	67 ± 2.3a	26.3 ± 0.8a
<b>SOF + albumina de ovo de galinha (8 mg/ml)</b>	70	65 ± 1.4a	25.6 ± 0.3a
<b>SOF + 10% SFB</b>	64	63 ± 8.5a	21.0 ± 1.0b

*Adaptado de Ali e Sirard, 2002.*

Segundo Gordon (2003), para a formulação de um meio de cultivo semi-definido que suporte o desenvolvimento de embriões com qualidade é necessária à adição de substratos, dentre eles, a glicose, o piruvato, lactato, os aminoácidos não essenciais (chamados NEAAs) incluindo a glutamina e a albumina sérica bovina (BSA), substâncias antioxidantes, e fatores de crescimento. Segundo o autor, alguns estudos sugeriram haver mudanças na conformação dos NEAAs no meio após as primeiras setenta horas adicionadas ao SOF. O grupo de NEAAs incluindo a glutamina foi responsável por aumentar significativamente a taxa do desenvolvimento de embriões nos estágios de oito a dezesseis células até chegarem ao estágio de blastocisto.

Gordon (2003) afirma que meios complexos suplementados com soro (ao exemplo do TCM 199 utilizado no estudo) e células somáticas adicionadas, são sabidamente eficazes pela manutenção e apoio no desenvolvimento de embriões bovinos jovens. Mas o uso de meios classificados como simples que tenham restrição de soro e substituição das fontes proteicas pela BSA geralmente já satisfazem o requerimento macromolecular provendo uma base sólida para o crescimento embrionário, diminuindo os custos de preparo do meio.

O soro fetal bovino é usado com fonte proteica que contém outras substâncias tais como lipídeos (esteroides, colesterol, etc.), hormônios, albumina e alguns fatores de crescimento que auxiliam na maturação *in vitro* dos oócitos. O complexo de aditivos pode ser adquirido em laboratórios comerciais que tenham certo grau de confiabilidade, pois nestas empresas os meios são testados contra diversos vírus e outros patógenos e os lotes costumam apresentar baixa variabilidade composicional (ANTONIOLLI, 2005).

Segundo Galli et al. (2003), dois são os meios mais utilizados na etapa de fertilização *in vitro*. São eles, o meio TALP (Tyrode's albumina lactato piruvato) e o meio SOF (fluido sintético do oviduto) os quais podem ser encontrados nas versões livres de glicose e com diferentes concentrações do anticoagulante heparina. Neles devem ser adicionados um suplemento de diferentes concentrações de heparina e do componente denominado tríade PHE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina) que auxiliam na motilidade e outros fatores importantes de suporte para o espermatozoide (DIESEL, 2010).

Segundo Semple et al (1995) a utilização do soro fetal bovino não se mostrou essencial em nenhum momento da PIV pós etapa da fertilização das amostras. Dessa forma foi sugerida pelo grupo a eliminação desse componente rico em fontes de lipídeo dos meios de cultivo *in vitro* a fim de permitir aos embriões uma maior tolerância aos procedimentos de criopreservação.

Vários são os meios que podem ser utilizados na etapa de cultivo *in vitro*, segundo Machado (2009). O SOF (fluido sintético do oviduto), o meio de cultivo celular (TCM), meio Ham's F-10, Garner's G1/G2 e HECM-6 (*hamster embryo culture medium*/ meio de cultivo embrionário de hamster) com acréscimo de fontes proteicas incluindo aminoácidos-essenciais e não essenciais, inositol e substratos com função energética. O uso do soro fetal no meio de cul-

tivo *in vitro* do zigoto ao estágio de blastocisto é rotineiramente empregado para o provimento essencial dos nutrientes e ambiente propícios ao desenvolvimento *in vitro* na espécie bovina.

A utilização de uma grande porcentagem de soro adicionado ao meio de cultivo também pode resultar na fragmentação embrionária diminuindo os resultados de blastocistos viáveis durante o cultivo *in vitro* (FARIN et al., 2001).

Segundo os autores, os embriões crescem num meio constituído basicamente de SOF com a adição da albumina sérica bovina (BSA) (GALLI e LAZZARI, 1996).

Os meios preparados em laboratórios de pesquisa para realização da PIV apresentam durabilidade de duas semanas, mas é recomendado o preparo na semana do uso, assim como o controle interno de qualidade do laboratório via aferição dos valores de pH e osmolaridade de cada nova partida.

Ferreira et al (2008) atestaram que os meios comerciais tem a validade média de trinta dias prorrogáveis por mais quinze dias mantendo sua atividade e não comprometendo as taxas de desenvolvimento dos embriões. Apesar de haver viabilidade dos embriões produzidos com o meio pós trinta dias aberto e mantido a 4°C, os resultados atestados não foram de qualidade comparada. Os testes de composição e variações de partidas dos meios foi realizado via técnica de Espectrometria de Massas com Infusão por Nano-Eletrospray com Chip.

## **2.4 Aspiração folicular e seleção dos oócitos**

Para fins de pesquisa geralmente a principal fonte de ovários para aspiração é aquela proveniente de abatedouros, onde são encontrados animais em diversas situações fisiológicas e nutricionais além da utilização de animais com um baixo valor genético e de valor econômico pouco expressivo. Por isso os resultados podem variar muito daqueles encontrados em publicações que trabalham isoladamente com animais de elevado valor reprodutivo, genético e zootécnico (DODE e RUMPF, 2002).

O transporte de ovários bovinos proveniente de abatedouros deve ser realizado em solução de transporte de acordo com o protocolo do laboratório. Ali e Sirard (2002) adotaram o meio de transporte (MT) à base de solução aquosa contendo os seguintes componentes: 0,9% NaCl, 100.000UI/L de penicilina, 100mg/L de estreptomicina e 250µg/L de anfotericina B da

marca Sigma-Aldrich®, Oakville, Canadá.

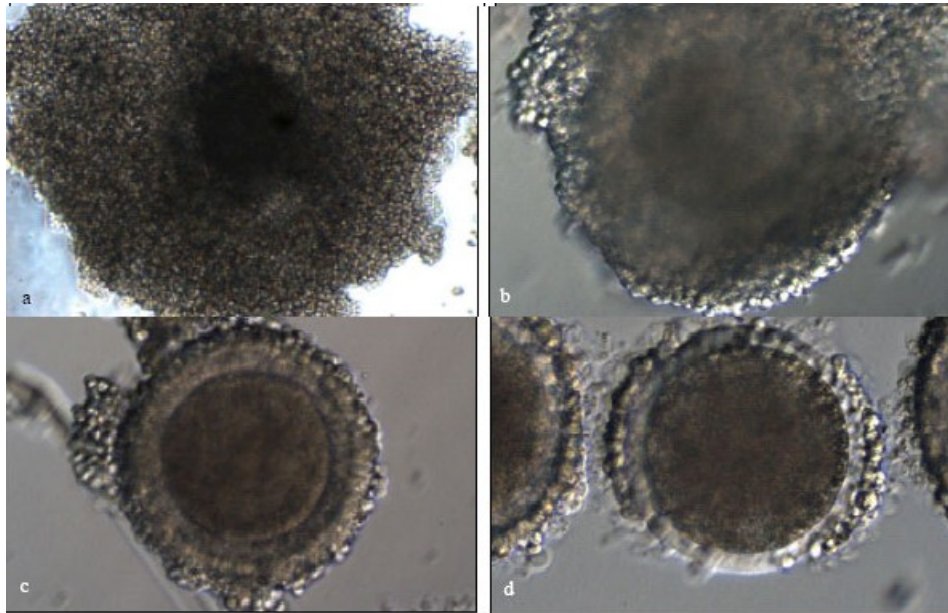
Os ovários dos mamíferos são constituídos basicamente de córtex, medula ovárica, plexo e folículos. Os folículos respondem como a unidade funcional do ovário, seu número é determinado nos primórdios da vida e diminuem com a senescência reprodutiva. O folículo é constituído do oócito e de suas células somáticas (células da teca externamente distribuídas e células da granulosa mais internas). As células da teca sintetizam os andrógenos pela conversão do colesterol, estimuladas pelo LH, e as da granulosa os convertem em estrógenos, estimulados pelo FSH. Sabe-se também que os receptores para o LH não se encontram exclusivamente nas células da teca visto que o nível de expressão aumenta nas células da granulosa em resposta ao aumento da concentração do FSH, anterior a onda de LH (McGEE e HSUEH, 2000).

Durante a vida fetal, os oócitos dos mamíferos iniciam seu processo de meiose e ao alcançarem o estágio de diplóteno da prófase I entram num estágio estacionário retomando suas atividades somente no período púbere em resposta aos estímulos das gonadotrofinas. Nessa etapa um grupo de folículos é recrutado para sofrer a finalização da meiose e se desenvolver durante o ciclo estral, e destes, apenas um vai emergir como folículo dominante promovendo o processo de atresia folicular dos demais (SIRARD et al., 2001).

A fase de crescimento dos oócitos varia de acordo com a espécie, e em grandes mamíferos como os bovinos, demora cerca de seis meses para ocorrer. Essa fase permite a construção da zona pelúcida do oócito, o acúmulo dos receptores espermáticos e dos grânulos corticais, e a produção de outros componentes presentes no evento da fertilização que não foram ainda totalmente elucidados. Com todas as etapas cumpridas, o processo de fertilização pode ser concluído e os eventos do desenvolvimento embrionário iniciados (SIRARD, 2001).

Os oócitos são classificados em graus de acordo com a morfologia citoplasmática e presença ou não da camada de células do *cumulus* envolvendo os mesmos. Os graus I e II são os de predileção para coleta e seleção durante a produção in vitro de embriões. Segundo os autores Baudi et al. (2006) oócitos de grau I são aqueles com COCs com citoplasma escuro e homogêneo, sem vacúolos citoplasmáticos e totalmente envolvidos por no mínimo duas camadas de células do complexo *cumulus* e os classificados em grau II são os que apresentam os COCs com citoplasma de coloração mais clara ou com presença de vacúolos, ou que apresentam falhas discretas nas camadas de células do complexo *cumulus*. Os oócitos

classificados em graus III e IV são aqueles que apresentam falhas ou ausência da camada de COCs, granulações e vacuolizações evidentes e outros indicativos de sinais de atresia (figura 02).



**FIGURA 02. Graus dos oócitos. a) grau I, b) grau II, c) grau II e d) grau IV.**

*Adaptado de Rahman et al, 2008.*

Ferramentas auxiliares como a adição de somatotrofina bovina recombinante (rBST) aos protocolos hormonais que precedem a técnica de aspiração folicular sugerem afetar a função reprodutiva do animal aumentando a síntese e secreção do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I). Além disso foi demonstrado um aumento da população folicular tendo efeito positivo na formação dos COCs e esteroidogênese (PIVATO, 2006).

Pivato (2006) afirma ainda que o recrutamento folicular promovido pela proteína recombinante além de afetar positivamente nos tratamentos de superovulação, traduz uma maior disponibilidade dos folículos que responderão a ação de outras gonadotrofinas exógenas presentes no protocolo. Também por possível efeito da rBST, insulina e IGF-I. Pfeifer et al. (2004), em outro experimento baseado em um teste de dieta alimentar com alto nível de energia, verificou uma maior porcentagem de oócitos de qualidade recuperados no grupo que recebeu o tratamento.

Em 2009 Pfeifer et al. avaliaram os efeitos da concentração da progesterona sistêmica

em relação à qualidade dos oócitos produzidos *in vitro*. Quinze animais mestiços foram avaliados e distribuídos randomicamente em três grupos, nos quais foram fornecidas diferentes concentrações de progesterona plasmática (P4). Cada grupo recebeu no dia zero, um dos tratamentos descritos. O grupo LP4 usou um dispositivo CIDR, o grupo HP4 usou dois dispositivos CIDR e o grupo VLP4 não recebeu nenhum tipo de tratamento com progestágeno. A AF (aspiração folicular) foi realizada a cada quatro dias durante um período de 24 dias e a P4 medida. A equipe observou que os melhores percentuais de viabilidade de oócitos (de graus I e II) foram obtidos no grupo de LP4 com 79,4%, seguido pelo HP4 com 68,4% e por último o grupo VLP4 que não apresentou diferenças significativas dos demais. Além disso, a taxa de produção dos blastocistos foi maior no de baixa dose (LP4), concluindo que os tratamentos com doses de P4 plasmáticas intermediárias resultam numa maior circulação de LH aumentando a capacidade de produção de embriões.

De 1992 a 1993 foi estabelecido que as concentrações séricas de FSH aumentam a cada início das ondas foliculares (variando de duas a três ondas na espécie bovina) e os episódios de decréscimo da secreção de LH estão associados à perda da dominância folicular e ao final da onda folicular não-ovulatória (IRELAND et al., 2000).

Segundo Sirard (2001), junto com o aumento dos folículos, algumas modificações no conjunto do *complexo cumulus oócito* (COCs) ocorrem antes do pico do hormônio luteinizante ser atingido. Dentre as modificações sofridas enumeram-se as seguintes: a redução do contato entre oócito e as células da granulosa, a vacuolização do núcleo, a movimentação ondular do nucléolo e a dispersão dos grupos de grânulos corticais. Em bovinos o pico pré-ovulatório do LH estimula um estágio final da maturação do oócito, seguido do processo de ovulação vinte e quatro horas após o início do evento (SIRARD et al., 2001).

Algumas técnicas podem aumentar o número e a qualidade dos oócitos recuperados na aspiração. No caso da OPU (*ovum pick up* ou aspiração folicular) para a produção *in vitro*, a frequência de aspirações juntamente ao estímulo hormonal folicular do FSH (hormônio folículo estimulante) antes do procedimento afetam positivamente a qualidade e quantidade dos oócitos. O grupo de pesquisa obteve em 2003 resultados finais próximos a 3,3 embriões por sessão de OPU, intervaladas a cada duas semanas (MERTON et al., 2003).

Segundo Blondin et al. (2002), não é somente através da indução do crescimento



populacional via protocolo com FSH que se obtêm COCs com desenvolvimento competente. A margem temporal entre o estímulo hormonal e a coleção folicular via aspiração afetam significativamente o complexo celular e seu potencial.

No trabalho realizado por Hendriksen et al. (2004) foram analisados três diferentes momentos do crescimento dos folículos em relação à insurgência dos picos da nova onda folicular e competência de desenvolvimento de oócitos. No grupo foram realizadas três sessões de aspiração folicular nos dias 2, 5 e 8, através do método conhecido como *ovum pick up* (OPU). Os dados obtidos não resultaram em diferenças estatísticas da concentração plasmática de progesterona. Foi observado que a proporção de oócitos com três ou mais camadas celulares compondo o COC foi maior no dia 5 (96%) quando comparado ao oitavo dia (68%), e no dia 2 não houve diferença significativa com o dia cinco do experimento. A proporção de oócitos que se desenvolveram ao estágio de blastocisto foi de respectivamente 27%, 29% e 15% (dias 2, 5 e 8) e os que tiveram o complexo cumulus oócito classificado como bom ou competente foi de 23%, 27% e 11% (dias 2, 5 e 8). Os resultados obtidos indicam a relação entre a diminuição da competência dos oócitos proveniente dos folículos não dominantes com a proximidade do estágio tardio da etapa de dominância folicular.

Apesar das alterações dos oócitos ocorrerem na fase de pseudodominância ou atresia folicular as células da granulosa são as últimas a demonstrarem sinal da degeneração. Dessa forma corre-se o risco maior de obtenção de COCs com reduzido potencial de desenvolvimento se aspirados durante a fase de crescimento do que no período de dominância folicular (BLONDIN et al., 2002).

Segundo Li et al. (2008) foi revelado que COCs que mostraram sinais de recente atresia tais como leve expansão do *cumulus* e granulação inicial do citoplasma, tiveram um aumento no potencial da competência dos oócitos quando comparado aos considerados inicialmente como morfológicamente saudáveis e de predileção para tornar-se um embrião viável.

Kane (2003) atesta que o problema rotineiramente observado na etapa de maturação *in vitro* é que mesmo os oócitos sendo obtidos de abatedouros ou coletados via OPU, a alta taxa de clivados após a FIV tende a sofrer um declínio representativo quando avaliada a porcentagem dos blastocistos formados. Essa diferença é minimizada quando se trata dos

oócitos circundados de quatro camadas ou mais de COCs que seguirão para a etapa de fertilização, sugerindo ser este um problema diretamente relacionado à maturidade do folículo.

Diesel (2010), em sua revisão, afirmou que a utilização de diferentes calibres de agulhas em gauges (17G, 18G, 19G, 20G ou 21G) exerce influência direta na pressão de aspiração realizada e conseqüentemente na qualidade morfológica dos oócitos e na taxa de recuperação dos mesmos. Segundo revisão do autor, com o aumento do diâmetro da agulha de 20G para 17G tem-se uma maior taxa de recuperação total de ovócitos, de 46 para 57%, e a taxa de recuperação de ovócitos cresce de 37 para 39%.

## 2.5 Maturação *in vitro* (MIV)

A técnica da produção *in vitro* de embriões oferece a possibilidade de otimizar a quantidade e o número de oócitos que se tornarão maduros e competentes o que numa situação fisiológica seria incompatível pós-onda folicular (MERTON et al., 2003).

Dode e Rumpf (2002) descrevem que durante a oogênese, os oócitos dos mamíferos chegam ao estágio de diplóteno na prófase da primeira divisão meiótica desde a vida fetal e ficam em quiescência até momentos antes da ovulação. A retomada pode ser mediada tanto *in vivo* por estímulo hormonal (aumento das concentrações de FSH e LH) quanto pela retirada do oócito do folículo para maturação *in vitro* (MIV) e realização da PIV.

O processo de maturação envolve mudanças nucleares e citoplasmáticas e estas devem ocorrer com a finalidade de capacitar os gametas de forma que esses tornem-se aptos para os processos seguintes.

Como o núcleo e o citoplasma dos oócitos sofrem diversas mudanças durante sua maturação, Sirard (2001) distinguiu artificialmente os três grandes eventos da maturação oocitária. São eles:

- 1) Maturação nuclear, que reflete o status da cromatina do estágio de dictóteno ao estágio da metáfase II (MII), caracterizado pela presença do primeiro corpúsculo polar e quebra da vesícula germinativa (DIESEL, 2010);
- 2) Maturação citoplasmática, que engloba todas as mudanças na distribuição e reorganização das organelas individualmente da vesícula germinal (VG) ao estágio de MII

onde o fator promotor de maturação (MPF) é ativado;

3) Maturação molecular, que se constitui em um legado de transcritos acumulados durante o estágio da VG que controla ambas as progressões, nuclear e citoplasmática, e a extrusão do primeiro corpúsculo polar.

Na MIV os oócitos passam para um meio rico em micro e macroelementos onde serão cultivados por algumas horas. Para que os processos fisiológicos *in vivo* sejam mimetizados dentro do pool de nutrientes e hormônios utiliza-se o meio para a maturação *in vitro* (denominado meio MIV) e os oócitos quando incubados nesse, em temperaturas e concentração de CO<sub>2</sub> adequadas, finalizam seu processo de maturação entre vinte e duas a vinte e quatro horas (DODE e RUMPF, 2002).

De acordo com ANTONIOLLI (2005), o processo de produção *in vitro* de embriões envolve diversas etapas críticas, dentre elas a maturação *in vitro* propriamente dita. Uma vez que todas as variáveis anteriores à maturação *in vitro* como a manutenção da temperatura no transporte dos ovários, o tempo entre o abate e o início do procedimento de punção folicular, o tamanho do folículo, os estágios de desenvolvimento dos oócitos, o diâmetro e homogeneidade dos oócitos e COCs, a composição do meio MIV e os hormônios podem alterar significativamente os resultados da pesquisa.

Segundo Dode e Rumpf (2002) diversos mecanismos estão associados ao fenômeno da maturação *in vitro*. Para suprir as demandas energéticas as células modificam sua capacidade de estocar algumas fontes de lipídeos como reserva. A distribuição das mitocôndrias e o conteúdo de ATP dos oócitos diferem os regulares dos considerados morfológicamente superiores.

Após a maturação, a redistribuição mitocondrial deve ocorrer de maneira organizada e mais central e o conteúdo de ATP total das células também deve ser maior. Desta forma o número total de blastômeros presentes nos embriões tem correlação positiva, ou seja, a capacidade da multiplicação celular vai ocorrer de maneira mais homogênea nos morfológicamente superiores (DODE e RUMPF, 2002).

A expansão das células do cumulus que circundam os oócitos também é um dos fenômenos observados. Oócitos compostos por células do cumulus compactas dispostas em diversas camadas e com um citoplasma homogêneo são considerados saudáveis e aptos para a

seleção dos que comporão o grupo da maturação *in vitro* (LI et al., 2008).

O grupo de células especializadas que estão metabolicamente associadas aos oócitos (COCs) vão promover pontos de projeções que atravessam a zona pelúcida (ZP) formando pequenas junções ou *gaps* que levam à conexão entre os meios e as moléculas presentes neles controlando quais substâncias permanecem no ooplasma. Durante esse processo é iniciada a secreção do ácido hialurônico que também exerce importante papel atuando ativamente no processo de fecundação, criando um espaçamento maior entre as células por causa de sua deposição (DODE e RUMPF, 2002).

Outra etapa essencial da MIV é o da maturação informacional dos gametas envolvidos no processo. Segundo revisão do autor, o oócito tem um sistema único de agregação informacional durante o processo meiótico que ocorre em nível de condensação máxima do RNAm. Durante a retomada da meiose, no período da prófase, o oócito quiescente sofrerá uma mudança na apresentação cromossômica para que o processo de transcrição seja assegurado. Nos machos o processo meiótico tem as mesmas etapas de restrições que ocorre nas fêmeas, mas o gameta masculino consegue sobreviver por um maior período de tempo sem novas instruções fornecidas pelo cromossomo (SIRARD, 2001).

Dessa forma segundo Sirard (2001), os gametas masculinos duram mais porque ocorre uma substituição das histonas por protaminas e como resultado tem-se a condensação da cromatina que pode permanecer por semanas antes do processo de fertilização. Com isso uma célula bem programada é capaz de exercer os papéis necessários para fecundar um oócito com qualidade. Porém se houverem quaisquer mudanças durante o processo de maturação e transcrição do DNA do gameta a célula tornar-se incapaz de continuar o processo devido a incompatibilidade da reprogramação celular.

Depois de vinte a vinte e quatro horas de incubação, os oócitos tem sua maturação completa com o evento de extrusão do primeiro corpúsculo polar tornando-se aptos ao evento seguinte da PIV, a fecundação *in vitro* (GALLI et al., 2003).

## 2.6 Escolha e preparo do sêmen

A escolha do doador do sêmen envolve uma análise criteriosa das diversas características desejáveis de herdabilidade à progênie. Dentre elas podemos destacar a maturidade sexual precoce, o índice de conversão alimentar próximo a um, a fertilidade e potencial de fecundidade da progênie e a resistência à doenças.

Segundo Zúccari et al (2008) a maneira mais precisa para a avaliação do potencial de fertilização do touro doador do sêmen é através da taxa de prenhez obtida pós fertilização. Porém pelo custo operacional ser alto bem como o investimento inicial na técnica, adota-se atualmente uma avaliação mais prática do sêmen criopreservado utilizado na PIV, de acordo os parâmetros espermáticos pré-estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

O sêmen é um grande veiculador de doenças por isso sua utilização é recomendada após análise do animal e histórico de doenças reprodutivas ou através de centrais próprias para a distribuição do material genético que o avalia antes de iniciarem o protocolo de congelamento e distribuição comercial.

Existe a possibilidade de ocorrer a contaminação cruzada de um animal a outro via componente infectado presente no meio durante o procedimento de envase pois as palhetas entram em contato direto com o material contendo meio/sêmen ou meio/embriões que serão envasados, selados e congelados. Por isso Gianaroli et al (2000) afirmam a importância de promover a limpeza e desinfecção externa das palhetas com álcool 70% antes e pós descongelamento, além do conhecimento do doador para possível rastreabilidade do material caso haja suspeita do fato.

Vários organismos patogênicos estão presentes no aparelho reprodutivo, no sistema linfático e corrente sanguínea (durante uma viremia ou bacteremia), e no sistema urinário. Dessa forma esses micro-organismos podem ser facilmente transmitidos pelo sêmen via líquido seminal ou por contato direto do material com urina contaminada. Foi confirmado por pesquisadores da área que todas as doenças listadas pela OIE (Organização Mundial de Saúde Animal) já foram isoladas de alguma forma amostral no sêmen (LE TALLEC et al., 2001).

A capacitação dos espermatozoides envolve diversas reações bioquímicas e mudanças

estruturais da membrana plasmática dos espermatozoides. Dentre as mudanças que ocorrem destaca-se o aumento da fluidez e permeabilidade da membrana plasmática a fim de facilitar a reação acrossomal para liberação das enzimas acrossomais que promovem a digestão da ZP, facilitando a posterior fusão dos pró-núcleos dos gametas envolvidos. Para que essa alteração estrutural *in vitro* aconteça são adicionados agentes capacitadores como a heparina e o cálcio ionóforo (ASSUMPÇÃO et al., 2002).

Em 1987 fora descoberto pelos pesquisadores Ax e Lenz que a classe dos polissacarídeos de alto peso molecular denominada glicosaminoglicanas (GAG) tem a capacidade de se ligar ao espermatozoide através de interações receptor-ligante de alta afinidade, e dessa maneira promovem uma diferenciação da membrana (reação acrossomal) favorecendo a capacitação espermática (AX e LENZ, 1987). A heparina pertence à classe das GAG e por isso é tão empregada nos meios de fertilização *in vitro*.

*Segundo Ax e Lenz (1987), touros com as taxas de não-retorno acima da média apresentam uma maior frequência de reações acrossomais quando expostos a protocolos com a adição de GAG in vitro.*

A capacitação do espermatozoide é um processo que envolve uma série de eventos bioquímicos e reações fisiológicas. Existem evidências de que esse processo esteja envolvido com a liberação do ejaculado que em contato com as secreções vaginais e uterinas proporciona um ambiente ótimo para capacitação final do espermatozoide para então ser direcionado à junção úterotubárica e promover a fecundação do oócito. As glândulas vesiculares dos bovinos tem a função de secretar uma variedade de proteínas que se ligam a superfície espermática e promovem as mudanças das propriedades intrínsecas da membrana alterando a permeabilidade, aderência e fusibilidade da mesma. Além disso, ocorrem outras reações como a ativação do acrossoma pelo acúmulo dos íons  $Ca^{2+}$  no canal de ATP cálcio dependente e de outras moléculas que auxiliam os eventos bioquímicos do processo, como o inositol (IP3). Segundo Gordon (2003) é sabido que esse processo é reversível com a reexposição do espermatozoide capacitado ao plasma seminal.

Além da seguridade frente às patologias o sêmen deve ser analisado utilizando diferentes variáveis para sua classificação. A avaliação da motilidade do espermatozoide é essencial para detectar a possibilidade do material trabalhado ser eficiente na penetração das

células do *cumulus* e da zona pelúcida. Mas o teste de motilidade não pode ser considerado como o único indicador da capacidade fecundante uma vez que os espermatozoides podem perder sua capacidade fecundante antes de perderem sua motilidade. Além disso outros autores classificam a avaliação da motilidade espermática como subjetiva e por isso sujeita a variações de acordo com o técnico que a executa e o treinamento dado ao mesmo (MACHADO, 2009).

Para determinar a motilidade é necessário tomar uma amostra do sêmen, que está sob análise, (cerca de 5 $\mu$ L) em uma lâmina previamente aquecida a 37°C e coberta com lamínula para avaliação microscópica. A lâmina pronta deve ser posicionada no microscópio de campo claro com uma placa aquecedora de lâminas acoplada e focalizar o microscópio no aumento de 200X a 400X. A partir daí é possível avaliar dois aspectos do conjunto. A motilidade ou seja, a quantidade medida em porcentagem (0 a 100%) de células espermáticas que possuem movimentos flagelar e de cabeça numa média de cinco a dez campos de observação, e o vigor, caracterizado como a qualidade e a rapidez com que os gametas em movimento atravessam o campo microscópico escalonado de zero a cinco, onde cinco é a pontuação de velocidade máxima (CBRA, 1988).

Para uma avaliação mais objetiva da motilidade a ciência já nos disponibiliza o acesso a testes complementares utilizando a fotomicrografia, videomicrografia ou o sistema de análise de movimento espermático via software CASA (Computer Assisted Semen Analyses) que segundo Machado (2009) fornecem outros dados e variáveis do movimento espermático como a trajetória, velocidade, amplitude e frequência do batimento flagelar.

Além da motilidade, outros testes são realizados para avaliar a qualidade estrutural e funcional da célula espermática. Segundo a autora existem evidências de que a baixa qualidade seminal compromete a reação acromossomal sofrida pelo gameta e a consequente descondensação da cromatina para formação do pró-núcleo, assim como a redução do número de embriões de boa qualidade, contribuindo com a falha no reconhecimento materno da prenhez (MACHADO, 2009).

Novos testes foram desenvolvidos para avaliar integridade do acrossoma e da cromatina, integridade da membrana e o teste da ligação à zona pelúcida do oócito. Atualmente são utilizadas substâncias fluorescentes para análise da integridade de membrana plasmática ao exemplo do diacetato de fluoresceína (FDA), o iodeto de propídeo (IP) e o fluorocromo SYBR-

14 (MACHADO, 2009).

O FDA diferencia as membranas íntegras das lesionadas, pois o marcador fluorescente é metabolizado por esterases intracelulares e convertido em carboxifluoresceína verde, que não é permeável à membrana íntegra e por isso se acumula no interior das células vivas sendo visualizável na coloração verde fluorescente. O Corante FDA também permite a detecção das células classificadas como semi-lesadas, ou seja, o corante é metabolizado e fica na mitocôndria intacta emitindo a coloração fluorescente localizado somente acima da peça intermediária (CARVALHO, 2008).

Já os marcadores SYBR-14 e iodeto de propídeo atuam como marcadores específicos de DNA e por isso podem ser usados em conjunto à outros para determinar os fatores que influem na viabilidade da célula. O SYBR-14 atua via emissão da coloração verde quando as células não têm degeneração do material genético e o IP emite a cor vermelha quando as células estão comprometidas. Machado (2009) também cita em sua revisão a utilização da técnica da coloração com eosina e nigrosina (E/N) mas este corante superestima a população de falsos negativos em relação a lesão celular. Em 2008 outro pesquisador, citado pela autora, demonstrou que a média de porcentagem dos espermatozoides com membrana intacta utilizando a técnica de eosina e nigrosina representou valores de 53,41% com variação  $\pm 14,57\%$  e comparado a mesma amostra com a técnica do FDA obteve valores de 45,39% com variações de  $\pm 7,46\%$ .

O sêmen usado na PIV normalmente vem na forma de apresentação criopreservada. O sêmen descongelado é preparado e avaliado antes de sua utilização com dose inseminante a ser adicionada ao meio FECfinal. Para tal fim foram desenvolvidos diversos métodos já descritos na literatura.

Zúccari et al (2008) citam os métodos mais comumente empregados para seleção da população espermática descrita por outros autores. O *Percoll*® e o *Bovipure*® permitem a preparação do sêmen por gradientes descontínuos de densidade; o *Sephadex* promove uma filtragem em coluna de gel; o método *swim-up* promove a migração ascendente das células em solução e o *wash* consiste na lavagem do sêmen por centrifugação para separar os debris celulares dos grupo celulares móveis e maiores.

Segundo Diesel (2010) os métodos rotineiramente utilizados na PIV são: a lavagem



por centrifugação, os gradientes de densidade (à base de colunas de *Percoll*®) a filtragem em coluna de fibra de vidro e migração ascendente (*swim-up*). Segundo Galli et al.(2003) o método mais empregado é o das colunas de *Percoll*® que promove a separação da fração móvel espermática das demais moléculas e restos celulares de diferentes pesos moleculares e densidade. Para Galli e Lazzari (1996) a técnica dos gradientes de *Percoll* descontínuos (colunas de 90% e 45% respectivamente) asseguram a maior taxa de recuperação dos espermatozoides móveis.

Segundo os autores, o *Percoll*® representa hoje uma das técnicas mais difundidas na PIV e consiste na separação e preparo do sêmen por meio colunas de diferentes densidades obtidas via centrifugação das amostras. Obtêm-se pela técnica uma taxa de recuperação espermática próxima dos 50% respondendo com a taxa de cinco a dez vezes maior que a esperada com o método *swim-up* ( ZÚCCARI et al., 2008).

Após a separação e preparo do sêmen utilizando as colunas de *Percoll*®, são preparadas placas com o meio de fertilização *in vitro* (FIV) contendo de 25 a 11 gotas de meio cobertas com óleo mineral, e em cada gota 15 a 20 oócitos maturados para que no final da etapa seja adicionado o volume final da gota de espermatozoide na concentração de  $1 \times 10^6$  espermatozóides/mL (BERMEJO-ÀLVAREZ et al, 2008).

O uso de um diluente eficiente e seguro para a criopreservação dos espermatozoides bovinos também é um dos fatores que influenciam nos resultados da produção *in vitro* de embriões. Segundo Carvalho et al. (2008), desde 1940 são realizados estudos para descobrir a função das macromoléculas dos componentes presentes nos diluentes crioprotetores utilizados nos protocolos de criopreservação de células espermáticas.

Vários são os componentes já consagrados como protetores no processo de congelamento dos espermatozoides, dentre eles estão a gema de ovo, o leite em pó desnatado e o complexo tris gema-leite. O mesmo autor realizou um estudo criopreservando células espermáticas de ovinos para demonstrar o potencial das proteínas e lipídeos presentes nos meios Tris-gema, Tris-gema-leite e leite em pó desnatado na sobrevivência dos espermatozoides durante o processo de criopreservação. Os testes realizados para avaliação da integridade de membrana foram com os fluorocromos IP e FDA no pós-descongelamento. Após análise da integridade de membrana, foram obtidos os resultados descritos a seguir:

- Para o tratamento com tris-gema a porcentagem de espermatozoides íntegros, semi-lesados e lesados na seguinte ordem  $47,53\% \pm 7,87\%$ ;  $23,45\% \pm 3,10\%$ ;  $29,88\% \pm 4,18\%$ ;
- Para o leite-gema os íntegros, semi-lesados e lesados obtidos na ordem  $63,17\% \pm 2,83\%$ ;  $13,27\% \pm 3,93\%$ ;  $24,32\% \pm 3,94\%$ ;
- Por fim o tratamento do tris-gema-leite com os seguintes resultados  $50,20\% \pm 7,68\%$ ;  $19,65\% \pm 2,29\%$  e  $30,10\% \pm 7,49\%$  para íntegros, semi-lesados e lesados respectivamente. Realizado o teste P com grau de significância de 95% apenas o tris-gema e tris-gema-leite obtiveram diferença estatística em relação ao leite-gema na porcentagem de íntegros (CARVALHO et al., 2008).

Os pesquisadores observaram maior integridade de membrana ao grupo celular submetido ao tratamento com o diluente à base de leite desnatado em relação aos outros diluentes. Para o grupo tais efeitos foram decorrentes da fração proteica do meio, que atua como um agente quelante contra os metais pesados contidos no meio, além de exercer o papel de solução tamponante à variações do pH (CARVALHO et al, 2008).

Outros testes podem ser realizados alternativamente para avaliação da qualidade da transmissão da informação genética do gameta. Nesse sentido, a integridade do DNA pode ser testada a partir de um dos protocolos dos seguintes testes de integridade de cromatina: TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick-end labeling); teste de Laranja-Acridina (AOF); método do Azul de Toluidina (AT) e SCSA (sperm chromatin structure assay) (MACHADO, 2009; MARTINS, 2006).

Segundo Gouveia (2011), desde 2008 destaca-se no país a utilização do sêmen sexado e o sêmen reverso dentre as tecnologias empregadas na PIV para um melhor aproveitamento genético. Com o sêmen sexado é esperado um crescimento do ganho genético em até 15% quando comparado ao não-sexado. O sêmen reverso também pode ser utilizado. Esta técnica consiste na utilização do sêmen que foi congelado sem a separação espermática, e quando descongelado passa na citometria de fluxo sendo sexado e usado na PIV. Segundo revisão da autora, uma dose de sêmen sexado ou reverso é capaz de fecundar até cem oócitos, otimizando o aproveitamento da tecnologia da produção in vitro de embriões (GOUVEIA, 2011).

## 2.7 Fertilização *in vitro* (FIV)

Para que haja progressão do processo, algumas etapas essenciais da PIV devem ser finalizadas. Dessa maneira, para que obtenha-se sucesso na etapa fecundação *in vitro* propriamente dita, as prévias incluindo a maturação completa dos gametas devem ser cumpridas de acordo com as minuciosidades do protocolo previamente estabelecido.

A fecundação depende da maturação do oócito, da capacitação espermática e do desenvolvimento do mecanismo de liberação de cálcio, para promover a fusão dos pró-núcleos dos dois gametas envolvidos, e por fim obter-se um desenvolvimento *in vitro* embrionário normal e satisfatório (DODE et al., 2000).

Segundo Dode e Rumpf (2002) a FIV é a etapa que consiste no co-cultivo dos espermatozoides e oócitos maduros num meio específico por um período médio de dezoito horas, sendo possível a minimização do período sem perdas nas taxas de produção dos embriões.

Segundo protocolo de Van de Leemput et al (1999), as palhetas de sêmen usadas na etapa de fertilização são descongeladas e centrifugadas sobre o gradiente de Percoll® por 30min a 700g mantidos em 25°C. A amostra do sêmen destinada à FIV foi obtida pela remoção do gradiente exceto os últimos 150µL do pellet. Como descrito em outro protocolo descrito pelo grupo de pesquisadores, os COCs foram transferidos a 430µL de meio de fertilização mas sem adição de glicose e com 100µL/mL de penicilina/estreptomicina substituindo a gentamicina. Por fim, 20µL da suspensão espermática (na concentração de  $0,5 \times 10^6$  céls/mL) 20 µL de heparina (concentração final de 10 µL/mL) e 20 µL de PHE foram adicionados ao meio de fertilização.

Para Galli e Lazzari (1996), ao mesmo tempo em que a porção do sêmen está sendo centrifugada, os oócitos maturados durante 22 à 24h devem ser realocados (depois da remoção parcial das células do cúmulus) e o conjunto reintroduzido em gotas contendo o meio de fertilização coberto com óleo mineral. Finalmente os oócitos serão co-incubados com os espermatozoides selecionados e preparados atendendo ao valor da dose inseminante (de acordo com o volume final da gota do FECfinal).

Segundo Galli e Lazzari (1996), um dos problemas mais comuns do co-cultivo *in vitro* é a detecção do fenômeno da polispermia. Pois os oócitos na maioria dos casos chegam a sofrer

a clivagem mas não se desenvolvem até o estágio de blastocisto. Dessa forma, para uma análise mais acurada em virtude da identificação desse fenômeno, faz-se necessário fixar e corar os oócitos em solução de ácido acético:etanol na proporção de 1:3 por vinte e quatro horas e usar o corante Lacmóide para então ser observado na microscopia de contraste de fase.

## 2.8 Análise da taxa de clivagem

A produção *in vitro* de embriões bovinos inclui as etapas de maturação, fertilização e cultivo dos oócitos.

A população de oócitos é coletada de folículos que variam de tamanho, de pequenos (3 a 5mm de diâmetro) a médios (6 a 10mm de diâmetro), com uma taxa de blastocistos estabelecida no *plateau* entre trinta a quarenta por cento. Porém o limitado sucesso da taxa de formação de blastocistos deve ser atribuído principalmente a heterogeneidade da população folicular fornecendo grupos de oócitos bem diferentes em termos de qualidade e grau de maturidade (HYTTEL et al., 1997).

A etapa de maturação *in vitro* ainda parece ser um dos fatores limitantes da técnica. Mesmo obedecidos os cuidados e critérios na seleção de populações de COCs homogêneos, somente cerca de 35% deles terão competência de produzirem blastocistos viáveis. As condições *in vitro* do cultivo embrionário não são as únicas responsáveis pela queda da taxa de blastocistos, visto que, se a etapa de maturação *in vitro* for suprimida inicialmente, o COC maturado *in vivo* e depois incubado *in vitro*, tem o potencial de desenvolvimento dos COCs é aumentado dobrando o percentual de blastocistos produzidos depois de onze dias de cultivo *in vitro* (BLONDIN et al., 2002).

Galli e Lazzari (1996) afirmam que os oócitos co-cultivados com a suplementação de células da granulosa e heparina num sistema de cultivo não estático respondem com uma maior taxa de desenvolvimento durante a maturação e melhora da qualidade dos embriões que serão submetidos ao congelamento.

Com o objetivo de determinar uma comparação entre a diferenciação morfológica sofrida pelo embrião (levando em conta o tempo de compactação) e o início da curva de LH, Van Soom et al. realizaram um estudo dos processos morfogenéticos envolvidos na PIV. Uma vez

que é sabida a relação entre a duração do período pré-ovulatório e a o início da curva de LH foi avaliado o tempo de alocação das células embrionárias nos seguintes eventos: compactação, blastulação e incubação (VAN SOOM et al., 1977).

Como resultado os pesquisadores atestaram a progressão do desenvolvimento morfológico do embrião logo após o início da curva de LH. Depois de quatro dias pós-ovulação a maioria dos embriões foi detectada no estágio de clivagem celular. No quinto dia os clivados tornaram-se mórula com fácil distinção entre os estágios de mórula inicial e mórula compacta, sendo a inicial composta por um grupo de células achatadas em um dos lados e a compacta sem ter distinção celular visível (VAN SOOM et al., 1997).

Dos 142 embriões coletados, cerca de 93% deles estavam intactos e foram corados com Azul de Toluidina para avaliação e contagem celular. Dos 67 embriões obtidos no D5, 35% não iniciaram o processo de compactação, somente 21% iniciaram o processo até chegarem a mórula compacta e 45% completaram o processo de compactação até chegar a blastocisto cavitário. (VAN SOOM et al., 1997).

Em 2000 Dode et al avaliaram o efeito do tamanho do folículo em relação a capacidade dos oócitos de sofrerem maturação nuclear e citoplasmática em vacas Nelore. Os oócitos foram obtidos de folículos aspirados com diâmetros de 1-2mm, 3-5mm, 6-8mm e  $\geq$  9mm. Todos foram submetidos ao mesmo protocolo de maturação, fecundação e cultivo in vitro e antes do processo de maturação foram avaliados e a porcentagem dos que estavam no estágio de vesícula germinativa foi de 89,9%, 90,1%, 85,7%, 100% ( $P < 0,05$ ). Os pesquisadores demonstraram que o tamanho dos folículos ( $P < 0,05$ ) não influenciou (dado obtido no resumo do trabalho) na taxa de maturação nuclear, e a porcentagem dos oócitos que alcançaram a MII foi de 88,8% para o grupo de 1-2mm de diâmetro, 87,8% para o grupo de 3-5mm, 92,9% no grupo de 6-8mm e 100% para o grupo com diâmetro maior ou igual a 9mm ( $P < 0,05$ ).

Dode et al (2000) afirmaram que a capacidade dos oócitos, proveniente de folículos que variam de 1 a 9mm de diâmetro, de reiniciarem e concluírem a meiose e de clivarem não teve diferença estatística no grupo de bovinos testados em seu experimento (tabela 02).

**TABELA 02. N° E ESTÁDIO NUCLEAR DOS OVÓCITOS OBTIDOS DE DIFERENTES TAMANHOS DE FOLÍCULOS APÓS MIV POR 24H, EM VACAS NELORE<sup>1</sup>.**

FOLÍCULOS (mm)	OÓCITOS (N°)	ESTÁDIO NUCLEAR (%)					
		VESÍCULA GERMINATIVA	PRÓFASE I	METÁFASE I	ANÁFASE I	TELÓFASE I	METÁFASE II
1-2	321	5(1,6)a	9(2,8)a	13(4,0)a	4(1,2)a	4(1,2)a	285(88,8)a
3-5	493	3(0,6)a	8(1,6)a	32(6,5)a	11(2,2)a	6(1,2)a	433(87,8)a
6-8	70	0(0)a	1(1,4)a	2(2,9)a	1(1,4)a	1(1,4)a	65(92,9)a
≥9	27	0(0)a	0(0)a	0(0)a	0(0)a	0(0)a	27(100,0)a

<sup>1</sup> valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente (P<0,05) pelo teste qui-quadrado *Adaptado de Dode et al. 2000*

## 2.9 Cultivo *in vitro* (CIV)

Durante o desenvolvimento embrionário ocorrem diferenciações morfológicas no embrião. Dentre elas destacam-se o processo de formação e a compactação do blastocisto e as diferenças de funcionalidade celular, que lideram a segregação das células do trofoectoderma (TEc) e da massa celular interna (ICM). Da ICM surgem todos os tecidos embrionários que vão desenvolver as estruturas, membranas e camadas externas do embrião, e do trofoectoderma será formada a placenta e demais anexos fetais (VAN SOOM et al., 1997).

Segundo Farin et al (2001), os embriões bovinos produzidos *in vitro* exibem características morfológicas únicas. Destacam-se a menor compactação das células constituintes da mórula, uma variação individual de blastômeros coalescentes, a aparência mais distinta de granulação da massa celular, uma menor área representando o espaço perivitelino, além de outras variações dos blastocistos que são compostos de uma maior proporção de grânulos e gotas lipídicas. Outras características também podem ser observadas nos blastocistos produzidos no meio contendo soro bovino, entre elas destaca-se a aparência mais escurecida dos blastômeros e a incompleta junção do complexo entre a ICM e o TEc.

Segundo Lonergan et al (2001) um importante conceito é o da distinção entre os termos “qualidade oocitária” e “qualidade embrionária”. Para o oócito é mensurado sua habilidade em ser fertilizado até o desenvolvimento de blastocisto. Já em relação a qualidade embrionária mensura-se a qualidade do blastocisto em estabelecer uma prenhez até o estágio de produção final do bezerro.

De acordo com Lonergan et al (2003), em geral, a maioria dos oócitos imaturos bovinos falham no desenvolvimento do estágio de blastocisto. Essa evidência sugere que enquanto as condições *in vitro* do laboratório podem ser críticas para o potencial desenvolvimento do embrião jovem, as características intrínsecas do oócito selecionado também são fator chave determinante para o aumento da proporção dos oócitos que se desenvolverão ao estágio pós fertilização.

Oócitos derivados de folículos muito pequenos mostram uma menor taxa de maturação e de blastulação com protocolos convencionais. Outro fator importante é a idade do animal doador. Quanto mais jovem o animal mais deficiente é o desenvolvimento da competência do oócito na maioria dos protocolos de produção *in vitro* de embriões (YANG et al., 1998).

Em estudo realizado por Bousquet et al (1999) na produção de embriões *in vitro* foram obtidos os seguintes resultados. Num total de 4145 oócitos (coletados em 437 sessões de aspiração) para a PIV, o grupo respondeu com uma taxa de clivagem de 78,6%. A média de embriões recuperados foi de 9,5 por grupo doador e o percentual de embriões viáveis para transferência dos mesmos foi de 47,9% dos clivados.

Segundo Farin e Farin (1995), o sistema de produção *in vitro* assume um desempenho que consiste com os limites percentuais de 30 a 50% do total de oócitos maturados de bovinos que alcançam o estágio de blastocisto.

Neves et al, (2010) explicam que mesmo com os avanços das biotécnicas da reprodução obtidos nos últimos anos, ainda temos uma baixa taxa de embriões que chegam ao estágio de blastocisto atingindo seu limite superior máximo de 40%. Outro índice que não apresenta retorno satisfatório é da gestação dada sua taxa de variação e limites próximos também dos 40%.

Gordon (2003) descreve o desenvolvimento embrionário e a classificação do estágio dos embriões. Fisiologicamente, depois de sua liberação, o oócito é envolvido pelas fimbrias do infundíbulo e dirigido ao interior do oviduto por movimento ciliar da estrutura tubárica. O oócito bovino é uma célula de 150 a 190µm de diâmetro que apresenta estruturas como a zona pelúcida caracterizada por uma cobertura acelular glicoproteica de 12 a 15µm de espessura, e um grupo de células foliculares denominado COC. No processo de fertilização ocorre a fusão nuclear, dando origem ao zigoto que começa a se dividir e as novas células provenientes das

mitoses que darão origem aos blastômeros.

Com a divisão dos blastômeros ocorrendo, novas estruturas vão se formando e o embrião em desenvolvimento vai recebendo uma classificação em relação ao estágio e contagem celular. A classificação mais consagrada pelos pesquisadores do meio acadêmico atual é a seguinte:

- Mórula inicial: Mi, presente nos dias 4 e 5, composta por cerca de 32 blastômeros e sua massa ocupa quase todo espaço perivitelíneo.
  
- Mórula compacta: Mc, encontrada nos dias 4 e 5, com cerca de 32 a 64 blastômeros. Unidos compõem uma massa densa que chega a ocupar cerca de sessenta a setenta por cento do espaço perivitelíneo. Aqui tem-se um sinal de diferenciação embrionária ainda que conservada sua capacidade totipotente.
  
- Blastocisto inicial: Bi, presente no dia 6/7, composto por cerca de 100 a 200 blastômeros. Nessa etapa inicia-se a formação da blastocele que é o espaço onde ocorre o transporte de fluido nas células trofodérmicas. Aqui o conjunto celular vai ocupar cerca de setenta a oitenta por cento do espaço perivitelíneo e é possível a diferenciação do trofoblasto da massa interna celular.
  
- Blastocisto: Bl, presente nos dias 7 e 8, constituído de 100 a 200 blastômeros com diferenciação visível do trofoblasto e disco embrionário, que é visualizável como uma massa densa e escura na porção apical do embrião.
  
- Blastocisto expandido: Bx, também visualizável nos dias 7 e 8. É constituído de mais de 200 blastômeros e com seu diâmetro aumentado de 1,2 a 1,5 vezes e com adelgaçamento da zona pelúcida em cerca de um terço da espessura original. Estes embriões, durante sua manipulação, podem sofrer a ruptura da ZP com perda total ou parcial da blastocele, uma vez que a zona pelúcida por estar mais fina tem a tendência de ser liberada.



- Blastocisto eclodido: Be, presente nos dias 8 e 9, constituído de cerca de 200 a 800 células. O embrião continua com a forma esférica, mas com o início de sua eclosão (com a ruptura da ZP) tem sua forma alterada com o extravasamento da estrutura celular. Além disso são mais frágeis, de difícil manipulação e muitas vezes aderem a placa de petri ou na parede das pipetas durante o procedimento de manipulação (PALMA, 2008a).

## **2.10 Destino dos embriões produzidos**

Desde meados da década de 90, o padrão adotado para a avaliação dos embriões utilizados pelos cientistas era o da classificação da qualidade com a escala de 1-5. Onde o (1) é representava um embrião excelente, (2) bom, (3) regular, (4) ruim, (5) degenerado de descrições variáveis. Mas com a maior necessidade de unificação dos dados é adotado na atualidade o padrão proposto pela Sociedade Internacional de Transferência Embrionária (IETS) que os agrupa em quatro grupos (excelentes e bons, regulares, ruins e degenerados), também de acordo com a descrição da qualidade do grupo celular e morfologia embrionária (CUTINI et al., 2000).

Segundo Galli et al. (2003) o zigoto sofre uma clara compactação celular nos dias D5/6 e a blastulação é observada no D7/8, e dessa maneira os embriões são classificados segundo manual da IETS, de acordo com seu grau de homogeneidade, compactação e morfologia celulares.

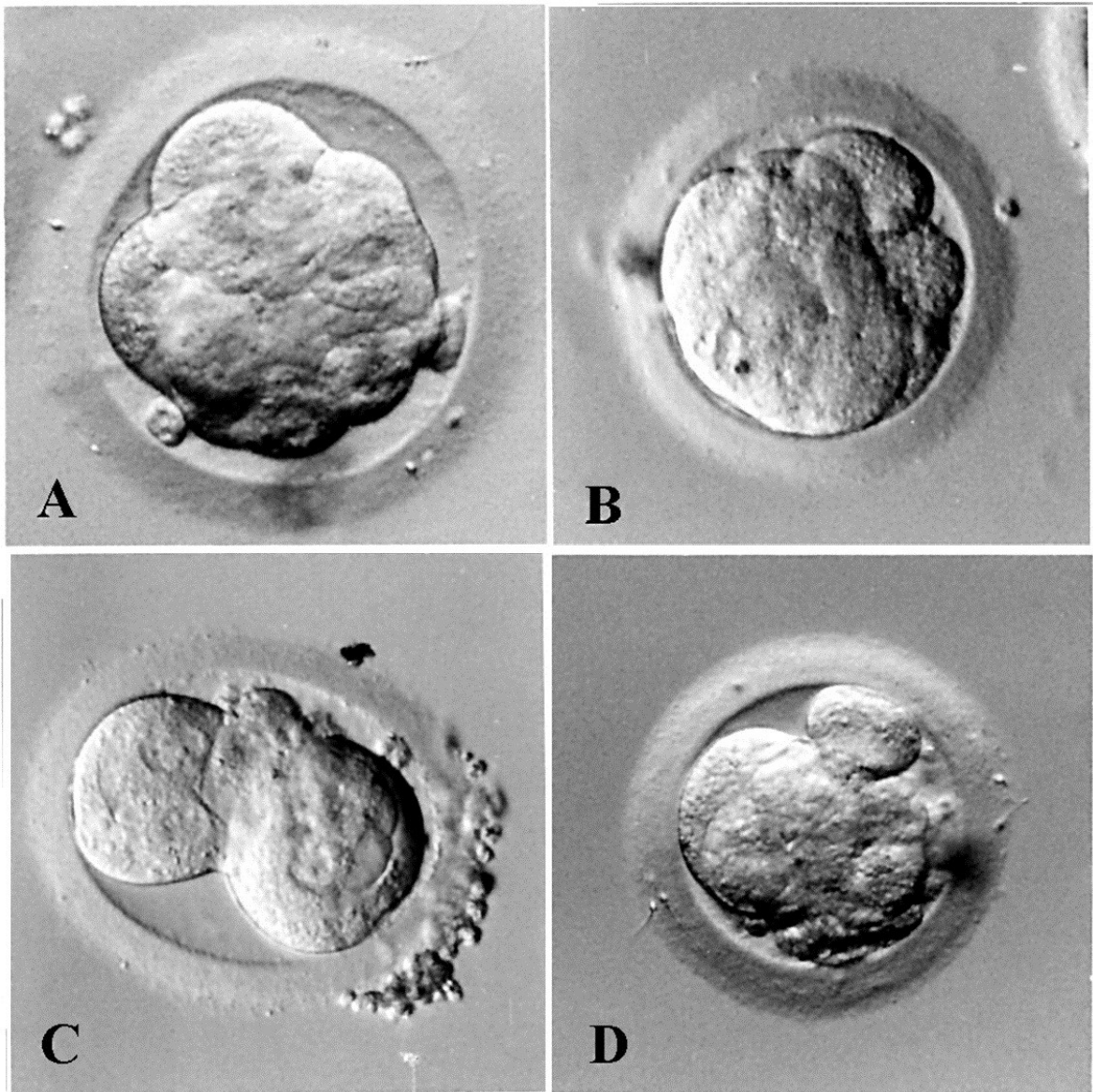
Um dos parâmetros mais utilizados para determinar a qualidade embrionária é a coloração dos blastômeros dos embriões que pode estar diretamente relacionado com o nível de colesterol proveniente da dieta que pode ser mensurado na corrente sanguínea das doadoras, no momento de aspiração dos oócitos.

Reichenbach et al. (1992) descrevem as seguintes características dos embriões durante a classificação frente à qualidade morfológica e conformacional. Para graduação excelente visualiza-se um embrião de forma esférica, simétrica, com células de tamanho e formato uniformes bem como a coloração e textura. No grau de classificação bom os embriões podem apresentar algumas imperfeições triviais como a presença de vesículas, leves irregularidades e poucos blastômeros extrusados. Para o embrião classificados como razoável verifica-se a

presença de vesiculações, diversos blastômeros extrusados e algumas células em processo de degeneração. Por fim, os classificados como ruins ou degenerados são os que apresentam inúmeros blastômeros degenerados, células de diversos tamanhos e formas, numerosas vesiculações mas a massa embrionária ainda parece ter aparência viável.

Os critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) são descritos a seguir (tabela 03):

- Código 1: Qualidade boa e excelente. Embrião com massa esférica e simétrica com células (blastômeros) uniformes em tamanho, cor e densidade. Cerca de oitenta e cinco por cento do grupo celular deve estar intacto e com a massa embrionária viável. Algumas irregularidades são permitidas desde que não alterem sua conformação geral. A classificação deve se basear na porcentagem de células embrionárias que é representado pelo material extrusado no espaço perivitelíneo. A zona pelúcida deve ser delgada e suave e não apresentar concavidade ou superfície plana que promove um ponto de aderência do embrião às paredes das palhetas e placas de petri.
- Código 2: Qualidade regular. Existência de moderadas irregularidades em torno de toda massa embrionária incluindo tamanho, cor e densidade celulares e individuais. Ao menos cinquenta por cento do material celular deve estar intacto para caracterizar a viabilidade embrionária.
- Código 3: Qualidade ruim. São observadas irregularidades maiores no formato da massa embrionária incluindo cor, tamanho, distribuição e densidade da massa e individual das células. Ao menos vinte e cinco por cento do material celular deve estar intacto para caracterizar a viabilidade embrionária.
- Código 4: Morto ou degenerado. São considerados inviáveis os embriões em processo de degeneração apoptótica, oócitos e zigotos que não progrediram em desenvolvimento e embriões de pouca ou nenhuma célula.



**FIGURA 03.** Fotomicrografia de mórula e embriões compactos em diferentes graus de qualidade.

A) Embrião de grau I, quase totalmente compactado com os blastômeros em processo de compactação.

Alguns núcleos podem ser evidenciados. B) Embrião de grau II, mais de e/4 da estrutura está compactada, sua forma se aproxima da esférica e existe uma suavidade das estruturas. C) Embrião de grau III, embrião com morfologia irregular e uma profunda indentação de superfície. D) Embrião de grau IV menos da metade dos blastômeros estão em processo de compactação e alguns fragmentos de blastômeros não compactados podem ser identificados. Aumento de X200.

*Adaptado de Tao et al, 2002.*

Quanto maior a quantidade de fontes de colesterol na dieta, maiores seus níveis

séricos, maior a quantidade de gotas lipídicas intracitoplasmáticas e mais escuros serão os embriões dessa linhagem (FARIN et al., 2001; CABODEVILA e TERUEL, 2008).

Segundo Cabodevila e Teruel (2008), menor também é a porcentagem de prenhez obtidas com mórulas compactas provenientes de doadoras com taxas sabidamente alteradas de colesterol sérico.

Dentre várias moléculas que estão envolvidas na habilidade do oócito em sustentar e melhorar o desenvolvimento embrionário, Boelhauve et al (2005) distingiram e traçaram o papel do polipeptídeo pleiotrópico leptina nos processos de fertilização e maturação do oócito.

Segundo Sirard (2001), o aumento do potencial de desenvolvimento do oócito também tem grande correlação com os mecanismos que antecedem a ruptura da vesícula germinativa. Sabe-se que para aumentar o potencial do oócito, é necessário que sejam dados comandos à célula no estágio folicular antes que ocorra a ruptura da vesícula germinativa. Em resumo, o cultivo do oócito no estágio de meiose estacionária pode potencialmente permitir e acessar o correto sinal (evento) para a mudança do potencial do oócito.

Farin et al (2001) descrevem em seu trabalho que os blastocistos produzidos *in vitro* classificados como de melhor qualidade apresentam maior número de células que os blastocistos de menor grau de qualidade.

Embriões que darão origem a bovinos machos têm a tendência de se desenvolver mais rapidamente *in vitro* que os embriões que originarão fêmeas. Mas segundo os autores abaixo, a proporção da razão entre machos/fêmeas não se difere à expectativa estatística de 1:1 quando avaliadas e genotipadas em determinado período de desenvolvimento (FARIN et al., 2001).

Os embriões PIV ou são transferidos a fresco via TE ou podem ser congelados, entretanto ainda existem muitos entraves para que resultados satisfatórios sejam obtidos com a criopreservação.

### **2.10.1 Transferência de Embriões**

Os métodos de transferência cirúrgica foram descritos por Palma (2008b): o primeiro método cirúrgico envolve uma laparotomia lateral com bloqueio anestésico local paravertebral (ex. Procaína 2%) para abertura do flanco e exposição do corno uterino ipsilateral ao ovário

contendo o corpo lúteo (CL) ou através do acesso bordo dorsal no terço anterior ao corno incisionado.

O segundo método desenvolvido em 1951 inicia-se com anestesia geral e posicionamento do animal em decúbito dorsal para incisionar a linha média (alba) e promover a abertura ipsilateral do corno determinado.

O primeiro e segundo método cirúrgicos envolvem a utilização da pipeta de Pasteur ou pipeta plástica com capacidade de 0,25 a 0,50mL contendo o meio com o embrião e o uso das suturas convencionais: invaginante, intradérmica e de pele para o fechamento do acesso. O terceiro método envolve a introdução de uma pipeta de vidro (capacidade mínima de 0,2mL de meio) através do ponto de punção para deposição do embrião diretamente no lúmen uterino.

Outro método menos oneroso e com menor risco de causar traumas no trato genital feminino e infecções devido a exteriorização dos órgãos foi desenvolvido. Segundo Palma (2008b) a técnica de transferência não cirúrgica é considerada de eleição pelos profissionais da atualidade. Mas a manipulação e preparo do profissional também exige diversos cuidados a fim de evitar infecções (por utilização de material inadequado ou pela assepsia ineficiente do manipulador) e contrações uterinas (por excesso de manipulação uterina) que prejudicam a eficiência da técnica.

O método consiste na introdução transcervical de um catéter de transferência (metálico ou de material plástico) com ponta atraumática com orifício lateral de onde sairá o embrião, que será guiada manualmente até o corno uterino. O catéter é composto de duas partes unidas com uma estrutura em rosca para encaixe da palheta plástica (0,25mL) contendo o embrião. Este catéter permite a passagem mais facilitada aos anéis cervicais por se tratar de uma estrutura rígida atuando simultaneamente como um dilatador da cérvix (PALMA, 2008b). Pela inflexibilidade do material maior porém é o risco de lesão na parede do endométrio, durante a passagem do mesmo, promovendo a liberação de fatores que comprometeriam a compatibilidade e estabelecimento da prenhez (CUTINI et al., 2000).

A partir do aprimoramento da transferência de embriões (TE) diversos foram os fatores analisados para determinação da influência no retorno positivo da técnica. Dentre elas destacam-se a qualidade e estágio de desenvolvimento e a idade do embrião, e a escolha da receptora. Segundo Cutini et al., (2000) o sucesso do método não cirúrgico está diretamente

relacionado à experiência do operador e a rapidez da técnica uma vez que a demora na transferência e um excesso de manipulação uterina, podem levar a luteólise provocando a morte embrionária.

Para a seleção das receptoras da TE os aspectos mais importantes são as condições de manejo (sanitário e da criação) e o estado nutricional da mesma (obedecendo um escore corporal desejado e fisiologicamente compatível com a manutenção da gestação). No momento da transferência o ideal é que a receptora escolhida esteja em sincronismo hormonal com a doadora ou que a assincronia seja de no máximo 24h, além disso é necessária a confirmação da presença do corpo lúteo no ovário ipsilateral ao procedimento. Ademais o estágio de desenvolvimento deve estar compatível ao dia do ciclo da receptora e dessa forma a TE deve ser realizada no momento em que a receptora se encontra na fase luteínica do ciclo (CUTINI et al., 2000).

Segundo os autores Cutini et al (2000), devem ser retiradas do programa imediatamente as receptoras que foram transferidas sem dificuldade na passagem do inovulador pela cérvix, no qual o método fora realizado com assepsia e excelência durante a operacionalização e cujos os embriões de boa qualidade utilizados após três tentativas não resultaram em prenhez.

As fêmeas receptoras são selecionadas somente se demonstrarem sinais de estro, se houver CL funcional presente no momento da TE e se não apresentarem cistos foliculares ovarianos além de anormalidades genitais que possam ser detectadas via palpação retal (REICHENBACH et al., 1992).

Alberio (1993) descreve a receptora como um animal reprodutivamente saudável e competente para dar prosseguimento ao crescimento do embrião até o término do período gestacional. A receptora deve apresentar um porte adequado para a parição do bezerro sem dificuldades e a raça da mesma (se tiver) presente tamanho igual ou maior ao da doadora. Além disso, a capacidade produtiva leiteira deve ser suficiente para alimentar o bezerro permitindo a expressão do potencial genético do mesmo.

Reichenbach et al (1992) realizaram um estudo das taxas de TE utilizando três diferentes tratamentos. O primeiro realizou a transferência de um embrião ao corno uterino ipsilateral ao CL, o segundo realizou a TE de dois embriões também ipsilateral ao ovário

contendo o CL, e no terceiro foi realizada a transferência de dois embriões, um em cada corno, sendo que o embrião de melhor qualidade era colocado no corno que apresentava o CL. Como resultado observaram que as taxas de prenhez não foram diferentes entre a TE unilateral com um embrião (47%) ou dois embriões transferidos (49%) em comparação à transferência bilateral (53%).

De acordo com a qualidade embrionária em relação à prenhez obtida, 54% das gestantes foram resultantes dos embriões excelentes ou bons, 51% dos regulares e 26% dos classificados como ruins. Também houveram diferenças notáveis das taxas de prenhez em relação aos estágios embrionários escolhidos para a transferência unilateral de um embrião. O estágio de mórula tardia teve um taxa de 39% de sucesso, os blastocistos iniciais obtiveram 43%, os blastocistos responderam com 49% e os blastocistos expandidos obtiveram a maior taxa de prenhez com 54% (REICHENBACH et al, 1992).

Cutini et al (2000) reforçam que a transferência deve ser realizada no corno uterino ipsilateral ao ovário contendo o corpo lúteo uma vez que o procedimento favorece o reconhecimento materno da gestação, e a migração transuterina que poderia prejudicar o evento é raríssima na espécie.

O estabelecimento da prenhez na transferência de embriões é um evento multifatorial que responde à diversos fatores, dentre eles bioquímicos, fisiológicos e interações hormonais. Segundo Farin e Farin (1995), a maior taxa de perdas gestacionais em bovinos é a correspondente ao período embrionário (do momento da concepção até o final da organogênese, do primeiro dia ao quadragésimo segundo em média). Os demais períodos, fetal e neonatal, respondem com uma taxa menos expressiva. A morte embrionária prematura que ocorre entre o oitavo e o décimo oitavo dia corresponde a aproximadamente 40% de todas as perdas de prenhez nos bovinos. Nesse período a perda gestacional representa o momento de liberação do interferon  $\tau$  (IFN $\tau$ ) para reconhecimento materno da prenhez.

Existem diversos estudos no meio veterinário que descrevem as taxas de prenhez obtidas TE usando dos mais diversos meios de cultivo e sistemas de cultivo *in vitro*, mas as taxas oscilam consideravelmente. De acordo com os autores as taxas de prenhez dos embriões produzidos *in vitro* variam na faixa de 45% à 75%, dependendo do meio de cultivo utilizado, se os embriões transferidos foram congelados, depende do grau e qualidade dos embriões

produzidos, do número de embriões transferidos por receptora, etc. A taxa de prenhez obtida com embriões congelados e envasados provenientes da PIV foi de 41% (FARIN e FARIN, 1995).

Para Dode e Rumpf (2002) a transferência de embriões proporciona um melhor aproveitamento das matrizes de genética de elite, e com o advento da PIV a média do número de crias por ano chega a atingir uma média dez vezes maior.

### **2.10.2 Congelamento de embriões**

A criopreservação de embriões de diversas espécies de animais domésticos se tornou rotina no protocolo da TE, e recentes descobertas são obtidas com o avanço da necessidade de otimização dos protocolos de criostocagem, possibilitando a maior viabilidade desse material genético (PALASZ e MAPLETOFT, 1996).

A criopreservação possibilita o armazenamento de diversos conjuntos de grupos celulares (sêmen, embriões, fibroblastos, células do cordão umbilical, etc.) criando um banco genético (germoplasma) de um material para o uso futuro em programas de reprodução. Além de expandir os diversos destinos favorecendo, o comércio nacional e internacional de reprodutores, os custos operacionais e de depreciação diminuem por exigir menos recursos para o deslocamento e desgaste do animal. Além disso também é possível ter um maior controle de enfermidades e doenças veiculadas a reprodução pois a rastreabilidade do material permite a detecção de um rebanho infectado ou até mesmo o *status* sanitário do estabelecimento de origem do material.

Cabodevila e Teruel (2008) descrevem a seguir algumas das técnicas consagradas da preservação de embriões bovinos. As mais comuns e rotineiramente utilizadas são: a técnica de resfriamento ou refrigeração, a congelamento convencional, a congelamento ultrarrápida e a técnica de vitrificação.

Segundo Cabodevila e Teruel (2008), são detalhadas a seguir as técnicas bem como alguns procedimentos e componentes das mesmas:

Todas as técnicas de criopreservação apresentam quatro etapas em comum. Para iniciar o protocolo de congelamento expõe-se as células à concentrações molares de um agente



crioprotetor; promove-se o resfriamento da temperatura fisiológica até um patamar suficientemente baixo que cause uma diminuição do grau de entropia e das reações químicas termicamente induzidas; para o descongelamento submete-se o aquecimento da temperatura até o alcance da fisiológica; inicia-se a substituição da osmolaridade do meio e promove-se a retirada do agente crioprotetor do interior celular.

A **refrigeração** é um método simples que visa a conservação dos embriões em temperaturas entre 4° a 0°C, mantidos num período de vinte e quatro a setenta e duas horas. Ela é uma técnica dita intermediária (entre o uso à fresco e o uso do produto descongelado), e permite a manutenção da viabilidade e desenvolvimento embrionário pós resfriamento da água intracelular mantendo a conformação e disposição das estruturas celular.

Para realizar a refrigeração se emprega o uso da solução a base de PBS com adição de soro fetal bovino ou albumina sérica bovina (variando as porcentagens de acordo com o protocolo pré-estabelecido). Os embriões são dessa maneira envasados contendo o meio em palhetas próprias de volume 0,25mL, refrigerados e mantidos até o momento de realizar a transferência do embrião para a receptora.

Um fenômeno comum que pode ocorrer na técnica é o colapso do blastocisto em que o embrião sofre uma espécie de contração rápida deformando reversivelmente a membrana externa e a disposição de suas estruturas internamente. Esse processo pode e deve ser revertido com um breve período de reincubação.

Essa técnica é utilizada em situações em que a receptora e as doadoras estão distantes ou em tempos reprodutivos assincrônicos, além disso ela obtém um bom índice de prenhez oscilando entre 44 a 50%.

**congelamento convencional** é a técnica de conservação a -196°C que permite que os embriões sejam mantidos em estado de latência mantendo sua viabilidade funcional por períodos mais longos àqueles descritos na técnica da refrigeração.

Nessa técnica os embriões alcançam seu equilíbrio osmótico antes de sofrerem o processo de resfriamento térmico e o mantém durante o procedimento. Esse processo ocorre lentamente para que o embrião possa se contrair de maneira controlada e assim perder parte do seu conteúdo aquoso em resposta a concentração gradual do crioprotetor da solução extracelular.

A técnica de congelamento convencional baseia-se no processo físico-químico de trocas de calor e água entre o meio e as células passam da fase líquida para a sólida, e a desidratação deve ocorrer gradualmente para evitar a ruptura das membranas e organelas devido a inevitável formação de estruturas glaciais.

Ao chegar a  $-10^{\circ}\text{C}$  ou  $-15^{\circ}\text{C}$  a formação de cristais de gelo ocorre de maneira espontânea produzindo um fenômeno com aumento brusco de temperatura denominado calor latente de fusão. Para que esse fenômeno prejudicial às células embrionárias seja evitado, induz-se mecanicamente a formação do gelo no meio extracelular, técnica denominada *seeding* ou cristalização induzida.

O *seeding* consiste em mergulhar uma pinça ou swab no nitrogênio líquido à temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$  e depois o instrumento deve entrar em contato direto com a palheta na coluna que contem o embrião induzindo a cristalização do meio.

Antes do *seeding* o embrião já deverá estar a temperatura de  $-7^{\circ}\text{C}$  por pelo menos 2 a 3 minutos. Após o *seeding* a temperatura continuará decrescendo, agora automaticamente, na razão de  $-0,3^{\circ}$  a  $-0,6^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até atingir a ponto de  $-40^{\circ}\text{C}$  que é o momento em que os embriões são mergulhados diretamente no nitrogênio líquido para sua manutenção a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Sabe-se também que é a temperatura na qual foi realizada a curva rápida de congelamento é que vai determinar o tempo e a velocidade de descongelamento que o meio deverá ser submetido para que não haja formação de estruturas que prejudiquem a viabilidade embrionária. Por exemplo, se a temperatura atingida antes do início da curva rápida foi de  $-40^{\circ}\text{C}$ , o descongelamento deve ser realizado em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  por um período de vinte a trinta segundos, mas caso esse ponto tenha ocorrido no  $-70^{\circ}\text{C}$  o descongelamento deve ocorrer com um aumento mais lento e progressivo da temperatura por um maior período de tempo. Para o protocolo de descongelamento pós-congelamento convencional são citadas três grandes técnicas denominadas *standard*, *one step* ou a técnica de transferência direta.

Imediatamente completado o processo de descongelamento, o crioprotetor deve ser retirado do embrião porque nesse momento ele passa a ter uma toxicidade maior para a célula e também deve ser diminuído o risco de choque osmótico. Para tal fim devem ser realizados banhos com solução tampão PBS em meios de concentrações decrescentes do crioprotetor e simultaneamente realizada a reidratação progressiva das células embrionárias.

Cabodevila e Teruel (2008) descrevem diferentes métodos para retirada do agente crioprotetor. O protocolo pode ser realizado em única etapa adicionando sucrose ao meio para criar uma força osmótica contrária, quanto a via utilização direta de um meio iso-osmótico contendo glicerol e sucrose. Pois a sucrose não vai penetrar nos arredores dos blastômeros enquanto isso o glicerol pode abandonar mais rapidamente o interior do espaço embrionário.

A **vitrificação** é uma técnica de criopreservação que utiliza elevada concentração de crioprotetores e dessa forma não ocorre a formação de cristais de gelo.

Segundo Green (2005) as soluções de vitrificação contêm ao menos um agente crioprotetor, sais e macromoléculas (ao exemplo do polietilenoglicol, albumina sérica bovina, PVP e o polissacarídeo Ficoll) que têm ação de estabilização e de reparação das membranas plasmáticas e celulares. Como descrito pela mesma autora, o princípio da técnica consiste em submeter o material celular à altas concentrações de crioprotetores para aumentar a viscosidade do meio que, quando combinado ao resfriamento rápido passaria do estado líquido ao estado vítreo (gel amorfo) devido a desidratação das células embrionárias. Sem que haja a formação de cristais de gelo.

A breve exposição ao crioprotetor ou conjugados de dois a três tipos de agentes, associados a técnica de resfriamento rápido diminuem os riscos de toxicidade dos crioprotetores aos embriões. Além disso a implementação da rápida taxa de resfriamento minimiza os danos celulares uma vez que a passagem pela zona de risco que varia entre 15°C a -5°C ocorre o mais rápido possível (GREEN, 2005; VAJTA, 2000).

Em Green (2005), são cinco as técnicas de vitrificação mais utilizadas nas indústrias de biotecnologia dos animais domésticos. São elas, a técnica convencional de envasamento em palhetas francesas de 0,25mL; o método OPS (*open pulled straw*); a técnica de vitrificação em grades de microscopia eletrônica de transmissão; a técnica de *cryoloop* e o método em micropipeta de vidro (GMP, *glass micropipette*), descritas a seguir:

1. A **técnica convencional** baseia-se no preparo da palheta de 0,25mL em cinco colunas intercaladas por bolhas de ar na seguinte ordem, 160µL de solução a base de sacarose, ar, 20µL de solução de vitrificação, ar, 20µL do meio contendo os embriões, ar e 160µL de solução de sacarose. E por fim imersa diretamente no nitrogênio líquido.

2. Na **OPS** as palhetas francesas são utilizadas mas como algumas adaptações. O algodão presente em uma das extremidades é removido e a palheta é submetida ao calor em sua região central para que o lúmen diminua pela metade do tamanho original e o menor diâmetro responderá como a nova extremidade da palheta que será cortada. Por capilaridade o meio de vitrificação contendo o embrião preencherá a nova extremidade e cerca de 1 a 2 $\mu$ L são introduzidos na palheta, que em seguida será submergida em nitrogênio líquido. Nessa técnica a taxa de resfriamento é de 20.000°C/min, cerca de oito vezes maior que a técnica convencional devido a redução da espessura da palheta e o aumento da área de contato com o meio.

3. A **técnica de vitrificação em grades** consiste da utilização de grades de microscopia eletrônica de transmissão como suporte físico dos embriões que serão transferidos em cerca de 1 $\mu$ L de solução de vitrificação para o topo da mesma, para serem mergulhadas diretamente em nitrogênio líquido num tempo não superior a 30 segundos.

4. O **cryoloop** consiste em um sistema composto de um cilindro de aço inoxidável envolto em um laço de nylon® de cerca de 0,5 a 0,7mm de  $\varnothing$  e 20 $\mu$ m de largura formando uma via de acesso para o N<sub>2</sub> e o embrião entrarem em contato. Enquanto os embriões são submetidos a primeira solução de vitrificação, o cryoloop é mergulhado numa segunda solução formando uma espécie de película de meio no laço de nylon®. Posteriormente o embrião já submerso no primeiro meio é colocado sobre a película com o auxílio de uma pipeta de vidro e todo o conjunto então é submerso em nitrogênio num intervalo máximo de 45" para conclusão do procedimento.

5. O **método da GMP** foi instaurado para otimizar a palheta de OPS uma vez que com a utilização do novo material podemos observar uma diminuição dos parâmetros do original plástico, para 1mm de diâmetro externo e 0,3mm de  $\varnothing$  interno que armazena um volume bem menor de solução (0,14mm<sup>3</sup>) e o material tem outras facilidades como a de não flutuar no nitrogênio líquido, característica essa observada na palheta plástica de OPS.

O **congelamento ultrarrápido** também se baseia na desidratação parcial do embrião e a exposição do mesmo a temperaturas abaixo de zero graus. A técnica tem semelhanças com a de vitrificação, mas ocorre uma cristalização intra e extracelular respondendo diferentemente ao princípio da vitrificação.

Aqui são utilizadas duas soluções com dois crioprotetores durante o procedimento de desidratação celular. As soluções podem ser compostas de 2 a 4,5M do crioprotetor permeável sendo ele o glicerol, propanodiol, DMSO ou etilenoglicol, e de 0,25 a 0,5M de um crioprotetor impermeável como a sucrose, lactose, trealose ou galactose.

As palhetas são colocadas num recipiente contendo nitrogênio líquido mas sem entrarem em contato direto com o nitrogênio. Existe um local ótimo no recipiente para colocação da mesma seguindo o nível do líquido, para que ocorra o processo de cristalização espontânea sem que seja gerado calor com a mudança de fase. Passado cinco minutos, as palhetas são retiradas do local e submergidas diretamente no nitrogênio líquido.

Quando o congelamento da água extracelular é promovido no método de congelamento rápido, a osmolaridade da solução é aumentada promovendo a perda da água dos blastômeros. Contudo, ainda é possível que ocorra a formação de estruturas glaciais intracelulares que podem lesionar as membranas e demais estruturas embrionárias caso aplicado o aquecimento do mesmo em faixas de temperaturas erradas.

Nessa técnica as taxas de sobrevivência embrionária se aproximam dos 30% e na PIV as porcentagens de eclosão utilizando 1,5M de glucose e 0,25M de sucrose chegam a atingir os 70%.

Martino et al. (1996) pesquisaram o desenvolvimento dos oócitos bovinos até o estágio de blastocisto, após serem submetidos ao protocolo de congelamento ultrarrápido. Após o tratamento os oócitos foram descongelados e cerca de trinta por cento deles clivaram quando realizada a técnica de fertilização *in vitro* (IVF) e cinquenta por cento dos que clivaram se desenvolveram até o estágio de blastocisto, obtendo a mesma taxa de sobrevivência do outro grupo de oócitos que foram submetidos à solução de 5,5M de etilenoglicol sem sofrerem tratamento térmico posterior.

Segundo Farin e Farin (1995), a produção *in vitro* embrionária leva a uma queda da resistência dos embriões ao procedimento de congelamento e envase. Estes embriões normalmente tem um acúmulo de gotas lipídicas, que no momento da criopreservação fazem com que haja uma desestruturação do citoesqueleto das células embrionárias. Quando do descongelamento, estas células perdem a capacidade de se reorganizarem e com isso a viabilidade embrionária fica comprometida.

Por isso um procedimento que vem sendo aplicado (desde 1995) no meio da produção *in vitro* de embriões é o da delipidização de embriões suínos e bovinos para aumentar a resistência à criopreservação do grupo celular.

As gotas lipídicas intracelulares podem ser facilmente removidas de células embrionárias nos estágios de uma ou duas células via centrifugação ou micromanipulação do embrião. Segundo Farin e Farin (1995) o procedimento responde a um aumento de embriões de boa qualidade que chegam ao estágio de blastocistos pós tecnologia, e em relação a biocompatibilidade do processo de criopreservação a tolerância desse grupo é maior quando comparados aos não interferidos.

Em 2001, Diez et al realizaram o estudo da delipidização via micromanipulação em zigotos bovinos. Como resultado os blastocistos tratados obtiveram uma taxa de formação de blastocistos similar ao grupo controle da PIV com 41,2% VS 45% respectivamente. A taxa de sobrevivência pós 48h realizada a técnica e recultivo dos embriões foi maior que no grupo controle 56,2 VS 39,8 com  $P < 0,02$ . E a taxa de prenhez do grupo tratado foi de 10,5% ( $P > 0,05$ ). Afirmando, com o estudo, a compatibilidade do desenvolvimento embrionário normal pós intervenção técnica proporcionando um maior ganho de resistência às lesões celulares quando submetidas à criopreservação (tabela 03).

**TABELA 03. N° DE BLASTOCISTOS SOBREVIVENTES E REINCUBADOS PÓS DELIPIDIZAÇÃO E BLASTOCISTOS CONTROLES CRIOPRESERVADOS.**

	n	Número de desenvolvimento <i>in vitro</i> (%)		Eclodidos
		24h	48h	72h
Delipidização	73	37 (50.7)a	41 (56.2)a	33 (45.2)a
Grupo controle	67	21 (31.3)a	22 (39.8)b	15 (22.4)b

a,b colunas com sobreescrito diferentes apresentam diferenças estatísticas ( $P < 0,02$ )

*Adaptado de Diez et al. 2001*

### 3. ESTÁGIO CURRICULAR

Com o objetivo de criar uma situação com condições reais às encontradas nos centros de produção comercial de embriões bovinos, foi proposto a adoção de protocolos de diferentes concentrações de SFB (5%, 2,5% e 0%) adicionados aos meios de CIV composto pelo SOF final. Para o desenvolvimento e repetibilidade do trabalho foram realizados quatro ensaios com a finalidade de produção de dados representativos para avaliação dos meios em relação à quantidade e qualidade de embriões produzido *in vitro*.

O trabalho foi realizado no Centro de Transferência de Tecnologia em Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira- CTZL, unidade pertencente à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA CERRADOS, em parceria com a Universidade de Brasília- UnB, no período de abril a julho do presente ano, totalizando 480 horas de trabalho.

#### 3.1 Lavagem e esterilização de materiais

Para lavagem dos materiais foi utilizado, no laboratório do CTZL, uma solução detergente comercial denominada EXTRAN® MA 02. Esse detergente neutro biodegradável da MERCK Millipore© tem propriedades de boa solubilidade em água a 20°C, densidade de 1.07 g/cm<sup>3</sup>, pH de 7,5 a 20°C, ponto de ebulição a 100°C, baixa formação de espuma e é de fácil enxágue.

Os materiais ficavam de molho na solução de EXTRAN® MA 02 (detergente neutro) na proporção de 20mL para cada litro de água por pelo menos uma hora antes do enxágue. Existem dois recipientes de polipropileno que armazenam os banhos e materiais utilizados durante a semana; um específico para os procedimentos de fertilização *in vitro* que exige um cuidado maior por apresentar etapas críticas (contendo os meios para a capacitação do espermatozoide, maturação e fertilização dos oócitos) e com restos de meios em que foram adicionados outros químicos além dos hormônios; e outro designados aos demais materiais de bancada.

As placas de petri são esfregadas com bucha macia a fim de evitar ranhuras na placa utilizada para seleção dos ovócitos tipo I e II e a utilização das escovinhas é destinada a

vidrarias (beckers, erlenmeyer, provetas) e tubos para centrífuga®. Em seguida todos os materiais são levados à estufa a 50°C e de lá são retirados para serem embalados em saco plásticos e/ou papel pardo para seguirem para a etapa da esterilização.

Para a esterilização os materiais são separados de acordo com o tipo de constituinte, se plásticos (placas de petri, tubos para centrífuga®, seringas, pipetas e bulbos) ou metálicos e vidros (erlenmeyer, provetas, beakers, lâminas de microscópio, etc.).

Materiais plásticos devem ser embalados separadamente em sacos selados de forma que seja criado um microambiente isolado pós-esterilização por micro-ondas, permitindo assim sua reutilização no preparo de meios novos.

O primeiro grupo é esterilizado por irradiação de micro-ondas utilizando um forno micro-ondas doméstico de uso exclusivo para o laboratório em potência máxima por 10 minutos, o segundo grupo é esterilizado por calor úmido em autoclave com a temperatura de 121°C e mantido de 25 a 30 minutos quando alcançada a temperatura final.

Meios que posteriormente serão filtrados e transferidos para tubos para centrífuga novos são esterilizados por óxido de etileno, óxido nítrico ou radiação UV.

#### Equipamentos e Instrumental utilizados no Laboratório de Reprodução Animal

A lupa usada foi da marca NIKON® modelo SMZ645, 220 v, o microscópio de campo claro modelo E200, 220v do mesmo fabricante. A platina térmica digital e a mesa térmica digital modelos PT0805 e MT2030 respectivamente, da marca NEOVET®.

A minicentrífuga para tubos para microcentrifuga® foi a HT MINI CENTRIFUGE modelo CM-160, rotação 6000rpm, 220v. As incubadoras marca SPECTRUN THERMO SCIENTIFIC, modelo Series II Water Jacket com os padrões de taxa de CO<sub>2</sub> e T°C estabelecidos em 5% e 38,5°C.

O aparelho micro-ondas utilizado foi da marca BRASTEMP©, modelo maxi BMS35A, 30L, 220v, potência 820W e a autoclave utilizada foi a MINY MANUAL TIMER da OMRON TATESI ELETRONICS CO., modelo Y222, 220v.



## 3.2 Produção *in vitro* de embriões

### 3.2.1. Obtenção dos ovários

Para a produção *in vitro* de embriões, os ovários utilizados na pesquisa foram provenientes de abatedouros-frigoríficos localizados no município de Planaltina-DF e Gama-DF. Durante a coleta até o momento da aspiração dos folículos, os mesmos foram mantidos à temperatura de 35° à 37°C no meio de transporte denominado LAV constituído de salina fosfatada (PBS), soro fetal bovino (SFB), penicilina, estreptomicina e heparina. Esse meio é preparado no dia anterior à coleta e mantido sob refrigeração até o dia seguinte.

A coleta dos ovários era feita pela própria autora da pesquisa que paramentava-se com as vestimentas próprias (incluindo macacão, botas, luvas, máscara, touca e óculos) para uma coleta segura, e a fim de minimizar ao máximo o carregamento de contaminantes que pudessem comprometer as etapas seguintes da pesquisa.

### 3.2.2 Aspiração folicular

Na chegada, os contentores aquecidos contendo os ovários eram rapidamente transferidos para o banho-maria a 37°C em um becker esterilizado para iniciar o procedimento de aspiração do líquido folicular.

O material da aspiração era composto de agulha hipodérmica canhão rosa (18G/ 1 1/2pol / 1,20X40), seringas descartáveis de 20mL, papel absorvente esterilizado, luvas de procedimento, máscara e touca, pinça babcock inoxidável previamente esterilizada para coleta dos ovários mantidos em solução LAV.

Os folículos eram aspirados manualmente e deveriam variar de 2 a 6mm de diâmetro. O conteúdo era despejado em tubos cônico para centrífuga de 15mL mantidos em rack e parcialmente submersos no banho-maria na mesma temperatura que os ovários.

Os ovários eram preferencialmente aspirados num período de 2-4h após sua chegada ao laboratório, e de acordo com o volume aspirado e despejado nos tubos para centrífuga, as técnicas entravam na sala exclusiva de clonagem e micromanipulação dos oócitos para iniciar as atividades de rastreamento.

### 3.2.3 Busca e seleção dos ovócitos

Após dez minutos de espera, o *pellet* composto de sedimentos celulares se formava e o mesmo era separado do tubo para realização da etapa de rastreamento e a triagem dos oócitos presentes na banda.

Em sala própria para o procedimento de rastreamento, os *pellets* obtidos dos tubos eram despejados em meio LAV (sem heparina) em uma placa de petri 60X15mm (composta de poliestireno cristal) esterilizada e acoplada a outra com quadrantes riscados para facilitar a procura dos oócitos.

Os oócitos rastreados eram classificados de acordo com o grau e agrupados em 20 à 30 oócitos para serem lavados em três gotas de meio LAV (sem heparina) para posteriormente serem submetidos à etapa de maturação *in vitro*. Os oócitos selecionados eram os de grau I e II em virtude do grau de uniformidade do citoplasma e presença das células do cumulus, como anteriormente descrito na revisão da literatura.

Ao final da etapa de rastreamento de oócitos, todos os grupos selecionados e previamente lavados eram passados em conjunto para a placa de petri contendo as gotas de meio de maturação e levados à estufa em seguida.

### 3.2.4 Maturação *in vitro* (MIV)

O transporte dos oócitos selecionados é concluído com a lavagem dos mesmos em duas gotas consecutivas de meio MIV para depois serem transferidos à placa MIV que será incubada de dezoito à vinte e quatro horas. A passagem do meio LAV para a placa contendo o meio MIV final não deve exceder 50 segundos e todas as etapas devem ser realizadas com o auxílio de placas aquecidas a 37°C para minimizar variações de temperatura e evitar a degeneração dos oócitos devido ao estresse térmico.

A placa de petri contendo as gotas do meio MIV (100µL cada) era preparada no dia anterior ao procedimento de coleta e aspiração, e as gotas eram cobertas com óleo mineral para estabilização do pH em estufa a 38,5°C com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio MIV é composto de salina fosfatada (PBS) ou TCM 199 HEPES (dependendo do estoque), SFB, hormônio luteinizante

(LH), hormônio folículo-estimulante (FSH), L-glutamina, penicilina e estreptomicina, pH 7,2, preparado na semana de uso e mantido sob refrigeração a 4°C.

### 3.2.5 Fertilização *in vitro* (FIV)

O sêmen é preparado para a etapa da fertilização *in vitro* que será realizada passado 18h de incubação dos oócitos na placa de MIV final. Dessa maneira é necessário o preparo do banho-maria a 37°C para descongelar as palhetas por 30 segundos e realizar a higienização das mesmas com álcool 70° GL antes de levá-las ao interior do fluxo laminar onde será realizada a FIV.

O sêmen utilizado no laboratório de reprodução animal do CTZL é congelado e de origem rastreável. As amostras de sêmen utilizadas na pesquisa foram obtidas de um doador Holandês da ALTA NITROFORM, de um Angus da CSS - LT CURVE BENDER (USA), e de um doador Nelore da fazenda EMBRAPA CERRADOS unidade CTZL.

No dia anterior foi preparado o meio FEC (composto de TALP + albumina, pH 7,2) para estabilização na estufa, e o *Percoll*® no minitubo para microcentrifuga nas porcentagens de 90% e 45% adicionando uma alíquota de 500µL de cada respectivamente para criar as colunas de centrifugação.

Todos os meios foram filtrados antes do uso com filtros de 0,22µm acoplados em seringas e colocados em tubos para centrífuga de 15mL ou 50mL novos e esterilizados por radiação gama (raio  $\gamma$ ) para refrigeração.

Após o descongelamento do sêmen, uma alíquota 5µL foi colocada em lâmina para visualização em microscópio de campo claro do vigor e da motilidade espermática antes do tratamento da amostra. Logo após foi adicionado lentamente no eppendorf® com o *Percoll*® todo conteúdo da palheta e o conjunto foi levado para a minicentrífuga onde foi realizada a centrifugação a 2200rpm por 10 minutos.

No fundo do eppendorf® forma-se um *pellet*, o sobrenadante é retirado e o pellet foi ressuspendido com 500µL de meio FEC e recentrifugado por 5 minutos. Novamente o sobrenadante foi retirado e adicionado 100µL de meio FEC, sendo uma alíquota de 5µL utilizada para avaliação de vigor e motilidade e outros 5µL para determinação da concentração

espermática na Câmara de Neubauer.

No laboratório de reprodução animal da EMBRAPA o protocolo estabelecido da dose inseminante é obtido pela seguinte fórmula:

$$(200\mu L / CNB) = X$$

$$X / MPP (\%) = D\mu L$$

Onde:

CNB é a média da contagem das células espermáticas obtidas na Câmara de Neubauer

X é o valor obtido da gota do FEC sobre a média da câmara

MPP é a motilidade das células espermáticas pós-*Percoll*®, dado em %

V<sub>final</sub> gota de FEC<sub>final</sub> é de 200μL

D é o volume da dose inseminante, lembrando que o V<sub>máx</sub> da gota não deve exceder 20μL.

Os oócitos maturados foram retirados do meio MIV, lavados em três gotas consecutivas de FEC e depositados na placa contendo as gotas de FEC final previamente estabilizadas e cobertas com óleo mineral. O FEC final é constituído do FEC, heparina, NaCl 0,9% e a tríade PHE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina). O volume da gota da dose inseminante é preparado e adicionado ao meio FEC final contendo os oócitos maturados que foram incubados por um período de 22 a 24h para conclusão da etapa de fertilização *in vitro*.

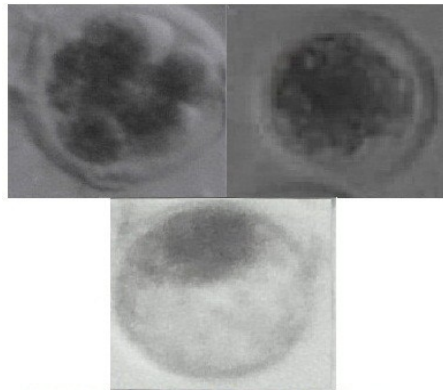
### 3.2.6 Cultivo *in vitro* (CIV)

Para a etapa final do cultivo *in vitro* é necessário o preparo dos meios contendo SOF IVC e as diferentes proporções de soro fetal bovino (5%, 2,5% e 0%) como proposto no modelo desse trabalho. Os três diferentes meios de SOF final foram produzidos no dia anterior utilizando o mesmo SOF IVC produzidos no mês corrente e armazenados em geladeira, e a mesma partida do SFB da marca GIBCO® da Invitrogen e filtrado conforme protocolo do laboratório.

Uma placa de petri (48X12mm) nova e esterilizada era usada por ensaio com três subdivisões na seguinte ordem: gota 1 (SOF IVC + 5% de SFB), gota 2 (SOF IVC + 2,5% de SFB) e gota 3 (SOF IVC + 0% de SFB). Todas as gotas apresentavam o mesmo volume (100 $\mu$ L) com a capacidade de receber 30 zigotos que seriam cultivados no meio SOF final cobertas com óleo mineral por um período médio de 24h.

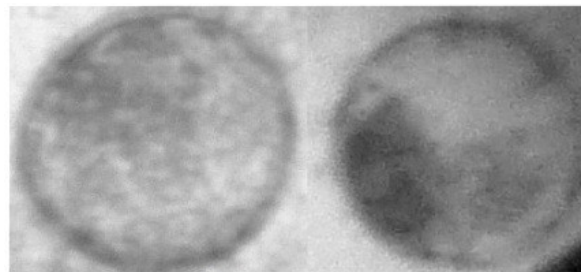
### 3.2.7 Avaliação da taxa de clivagem e de produção de blastocistos

Para avaliação da taxa de clivagem os possíveis zigotos eram observados no dia 2 (D2), e as taxas de mórulas e de blastocistos eram analisados os dias 7, 8 e 9 para observação dos embriões formados com potencial de serem criopreservados (figuras 04 e 05).



**FIGURA04. Mórula inicial, blastocisto inicial e blastocisto.**  
Fonte: Arquivo Pessoal, 2012.

A avaliação mais prolongada para observação da formação de blastocistos fez-se necessária para adequação do estudo, uma vez que os ensaios demonstraram desde o início um comportamento retardatário aos descritos por outros pesquisadores.



**FIGURA 05 Blastocistos expandidos.**  
Fonte: Arquivo Pessoal, 2012.

O resumo dos resultados obtidos nos ensaios estão apresentados na Tabela 04.

**TABELA 04. RESULTADOS DOS ENSAIOS REALIZADOS PARA AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE EMBRIÕES COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SFB NO MEIO DE CIV.**

		<b>GOTA 1 (5% SFB NO MEIO CIV)</b>	<b>GOTA 2 (2,5% SFB NO MEIO CIV)</b>	<b>GOTA 3 (0% SFB NO MEIO CIV)</b>
<b>ENSAIO 1</b>	Nº de oócitos coletados	29	25	28
	Clivados no D2 n°(%)	10 (34,48%)	13 (52%)	12 (42,85%)
	Embriões produzidos	ndn	ndn	1 Bx
<b>ENSAIO 2</b>	Nº de oócitos coletados	28	27	28
	Clivados no D2 n°(%)	14 (50%)	15 (55,5%)	16 (57,14%)
	Embriões produzidos	ndn	ndn	1 Bi 1 Bx
<b>ENSAIO 3</b>	Nº de oócitos coletados	28	31	27
	Clivados no D2 n°(%)	14 (50%)	16 (51,61%)	14 (51,85%)
	Embriões produzidos	3 Bi 1 Bx	ndn	2 Bi
<b>ENSAIO 4</b>	Nº de oócitos coletados	28	27	27
	Clivados no D2 n°(%)	15 (53,57%)	13 (48,14%)	14 (51,85%)
	Embriões produzidos	ndn	1 Bi 1 Bx	ndn

Em ndn lê-se nada digno de nota.

A população de oócitos escolhida deveria ter as características o mais próximas possíveis dos graus I e II, porém não eram descartados os oócitos de qualidade III que poderiam compor o grupo a fim de completar a população amostral mínima de 25 oócitos por grupo por ensaio.

No primeiro ensaio foi realizado a coleta de 29 oócitos para a gota 1, 25 oócitos para a gota 2 e 28 para a gota 3 e obtidas as seguintes taxas de clivagem 34,48%, 52% e 42,85% respectivamente. Esse ensaio não resultou em blastocistos ou mórulas tardias nos dias D7 e D8 das gotas 1 e 2 e somente um blastocisto expandido foi obtido na gota 3. Na placa foi observado uma turvação do meio e aglomeração de estruturas puntiformes escuras ao redor dos oócitos maturados que eram aderentes aos mesmos. Esse evento condizia com descrições de contaminação das estruturas do ensaio. O fato pode ter colaborado majoritariamente para uma desigual taxa de clivagem bem como a baixa produção de embriões.

Por se tratar de um pequeno número de embriões resultantes do primeiro ensaio e pela detecção da contaminação, foi decidido que o mesmo não passaria para a etapa seguinte de congelamento pelo custo da etapa ser maior que o ganho produzido.

No segundo ensaio foram coletados 28, 27, e 28 oócitos para as gotas 1, 2 e 3 respectivamente. O resultado das taxas de clivagem foram 50%, 55,5% e 57,14% mostrando uma melhora dos valores obtidos quando comparados ao primeiro ensaio podendo evidenciar o

trabalho com um melhor grupo de folículos ovarianos aspirados no dia, bem como o fato de duas técnicas realizarem a seleção e rastreamento dos oócitos para a pesquisa. Nesse ensaio os resultados foram parcialmente semelhantes ao anterior uma vez que somente a população de oócitos clivados e maturados da gota 3 deram origem a um blastocisto e um blastocisto expandido.

Porém nesse ensaio houve novamente a detecção de uma turvação dos meios, novamente indicativo de contaminação. Na análise das gotas foi observado que a 1 e 3 tiveram uma sutil turvação quando comparados a segunda gota. Entretanto estas mesmas gotas (1 e 3) foram as únicas que tiveram embriões formados, mas novamente optou-se pelo não congelamento dos mesmos a fim de evitar criar uma fonte de contaminação nos botijões de nitrogênio líquido que os armazenariam.

No terceiro ensaio foram selecionados 28 oócitos para a gota 1, 31 oócitos para a gota 2 e 27 oócitos para a gota 3 com as seguintes taxas de clivagem 50%, 51,61%, e 51,85% respectivamente. Nesse ensaio novos resultados foram obtidos, diferentes do padrão que estava se estabelecendo nos ensaios anteriores. Na gota 1 houve o desenvolvimento de três blastocistos e um blastocisto expandido formado entre os dias D7 e D8. Na gota 3, 2 blastocistos e na gota 2 novamente foi repetido o resultado de nenhum embrião formado. No dia seguinte (D9) foi realizado o protocolo de congelamento de embriões e na reavaliação da placa a gota 1 apresentava três blastocistos mais um blastocisto expandido, e a gota 3 apresentava três blastocistos propriamente ditos e dois blastocistos expandidos.

Os meios desse ensaio pareciam estar mais límpidos mas ainda não estavam com a aparência próxima do ideal. Nesse ensaio todos os embriões foram congelados por grupos, se pertencentes ao tratamento com 5% ou 0% de SFB, e envasados na mesma palheta identificada com a data a quantidade e classe dos embriões.

No quarto ensaio 28 oócitos foram selecionados para a gota 1, 27 oócitos para a gota 2 e 27 oócitos para a gota 3. A taxa de clivagem analisada em D2 foi de 53,57%, 48,14% e 51,85% para as gotas 1, 2 e 3 respectivamente. Como resultado de embriões produzidos apenas na gota 2 foi observado a presença de um blastocisto inicial e um blastocisto expandido no D8/D9 sendo que o Bi apresentava características pouco desejáveis como a perda da conformação arredondada perfeita porém detectava-se uma região que condizia com a

blastocite. Nesse ensaio os meios estavam límpidos e adequados aos padrões e os embriões foram congelados em palhetas separadas e identificadas de acordo com o grupo de tratamento e a classificação do embrião obtido.

Nos primeiro e segundo ensaios foi utilizado uma amostra de sêmen comercial do mesmo doador Holandês da ALTA, no terceiro ensaio foi utilizado o sêmen importado de um doador Holandês envasado pela CSS e no último ensaio foi utilizado o sêmen do touro Nelore doador da unidade CTZL.

### 3.2.8 Criopreservação dos embriões

Para o protocolo de congelamento de embriões foi utilizado o crioprotetor etilenoglicol TQC da Nutricell® composição 0,4% de BSA (albumina), 0,1M de sacarose e 1,5M de etilenoglicol, partida 001/09, fabricação abril/09, e o maquinário pertence a TK Equipamentos para Reprodução - Tecnologia em congelamento, aparelho TK3000®.

O protocolo de congelamento foi seguido segundo o manual da máquina. Primeiramente ocorre o resfriamento e a estabilização do porta palhetas em  $-6^{\circ}\text{C}$ , em seguida são inseridas as palhetas, e após 2 minutos de estabilização a  $-6^{\circ}\text{C}$  realiza-se o *seeding* manualmente (cristalização induzida). Passados 10 minutos da etapa da cristalização induzida, a máquina prossegue com a diminuição da temperatura utilizando a curva de decrescimento de  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até atingir  $-32^{\circ}\text{C}$ . Passados 5 minutos do término da congelamento as palhetas são submersas diretamente em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão.

### 3.2.9 Descongelamento dos embriões e re-cultivo

Para o descongelamento dos embriões as palhetas ficaram em contato com o ar por 10 segundos, em seguida submergidas completamente em banho-maria à  $32^{\circ}\text{C}$  por um período de 30 segundos. Retiradas do banho foi realizada a limpeza da mesma com álcool 70%GL, retirado o lacrador plástico e com auxílio de um êmbolo o conteúdo foi vertido em uma placa de petri nova e esterilizada, contendo uma solução de PBS com 5% de soro fetal bovino.

Nessa placa os embriões foram recoletados para uma nova lavagem em meio *holding*



(ou meio de manutenção) para retirada do crioprotetor, que nesse momento apresenta alta toxicidade às células embrionárias.

A lavagem foi realizada em três gotas consecutivas de holding para em seguida serem transferidas para mais três gotas de SOF final. Para o re-cultivo dos embriões, foram depositados na nova placa estabilizada com as gotas do SOF final cobertas com óleo mineral, como segue:

- Na gota 1 referente ao cultivo com 5% de SFB três embriões foram re-cultivados;
- Na gota 2 referente a 2,5% de SFB dois embriões re-cultivados;
- Na gota 3 referente a 0% de SFB obtivemos cinco embriões em re-cultivo.

### 3.2.10 Avaliação da taxa de reexpansão e de eclosão

Nas primeiras 24h de incubação os embriões não apresentaram um aumento significativo de tamanho retratando um quadro mais fidedigno à manutenção da contração das estruturas celulares sofridas durante a criopreservação.

Nas 48h de cultivo os embriões foram novamente avaliados e nesse momento parte deles começava a demonstrar a expansão de suas estruturas e melhora da aparência que era descrita até o momento como um grupo de embriões cujos blastômeros sofreram intensamente com a criopreservação por apresentar granulações citoplasmáticas aparentes.

Nas 72h pós descongelamento todos os grupos de embriões sofreram reexpansão das estruturas e nas gotas 1 e 3 houveram dois embriões que praticamente duplicaram seu tamanho. Na primeira gota um deles chegou próximo do esperado ao que seria um início de eclosão mas estacionou no estágio de deformidade e adelgaçamento da zona pelúcida.

Entretanto foi observado que a qualidade embrionária pós descongelamento era pobre, indicando que possivelmente o acúmulo de lipídeos ocorre já na fase de MIV dos oócitos, e com isso, leva a uma baixa resistência ao processo de criopreservação convencional.

#### 4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A baixa taxa de embriões sobreviventes ao congelamento representa um dos grandes entraves das taxas de sucesso da PIV. Por esse motivo, o estudo analisou o impacto de diferentes concentrações de SFB no meio de cultivo a fim de tentar melhorar a capacidade de sobrevivência dos embriões submetidos aos métodos convencionais de criopreservação.

Em resumo, as médias obtidas da taxa de clivados por tratamento foram de 47,01% (gota 1), 51,81% (gota 2) e 50,92% (gota 3), abaixo da média obtida por outros autores. O número de embriões produzidos por tratamento foi de 4, 2 e 5, respectivamente. Possivelmente os resultados obtidos estiveram abaixo dos citados na literatura devido à demora no processamento dos oócitos, escolha dos mesmos sem poder selecionar adequadamente, já que os melhores eram destinados à clonagem. Também houve interferência das contaminações, o que leva a uma queda acentuada na PIV. As taxas finais de reexpansão e eclosão foram insatisfatórias. O valor nulo da taxa de eclosão é indicativo de lesão celular, e de uma sensibilidade a criopreservação. Dessa forma, ensaios complementares devem ser realizados para a conclusão do proposto nesse estudo.

Os ensaios complementares devem adotar três medidas para correção dos resultados obtidos, são elas: um maior número amostral de oócitos, diminuir o tempo entre a aspiração dos folículos, seleção dos oócitos e colocação na MIV e a utilização de um sêmen previamente testado.

Em geral estudos desse tipo utilizam maior número de oócitos, ao exemplo de Lonergan et al. (2001), Dode et al. (2000) e Antonioli (2005). Como critérios de seleção do sêmen, devem ser realizados testes microbiológicos.

O aprimoramento dessa linha de pesquisa poderia viabilizar a melhora da técnica da PIV, possibilitando um aumento das taxas de prenhez obtidas com embriões criopreservados. Também proporcionaria expansão no uso da técnica, permitindo o aproveitamento de todos os embriões produzidos, que em muitos casos tem o excedente descartado, com isso reduzindo custos e ampliando a acessibilidade de pequenos criadores, que poderiam ser beneficiados com embriões de genética superior.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERIO, R. H. Manejo de donantes y receptoras. Em PALMA, G. A; BREM, G. **Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina**. Primera Edición, 1993, p. 25-31.

ALI, A. e SIRARD, M. A. Effect of the Absence or Presence of Various Protein Supplements on Further Development of Bovine Oocytes During In Vitro Maturation. **Biology of Reproduction**, v.66, 2002, p.901-905.

ANTONIOLLI, C. B. Produção In Vitro de Embriões Bovinos Utilizando Diferentes Condições de Maturação. **Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)** / Faculdade de Veterinária, Porto Alegre-RS, Agosto, 2005, 32p.

ASSUMPTÃO, M.E.O.D.; HAIPECK, K.; LIMA, A.S.; MELLO, M.R.B.; OLIVEIRA, L.J.; OLIVEIRA, V.P.; TAVARES, L.M.T.; VISINTIN, J.A. Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.39, n.2, p. 149-156, 2002.

AX, R. L. e LENZ, R. W. Glycosaminoglycans as Probes to Monitor Differences in Fertility of Bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 70, issue 7, july, 1987, p. 1477-1486.

BAUDI, D. L. K.; SPERCORSKI, K. M.; MORAIS, R. N. Maturação in vitro de ovócitos de gata doméstica (*Felis catus*) - In vitro maturation of domestic cat (*Felis catus*) oocytes. **Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 19-22, 2006 . ISSN: 1517-784X

BERMEJO-ALVAREZ, P.; RIZOS, D.; RATH, D.; LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A. Can Bovine In Vitro-Matured Oocytes Selectively Process X- or Y-Sorted Sperm Differentially? **Biology of Reproduction**, v. 79, 2008, p. 594–597.

BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F.; SIRARD, M. A. Manipulation of Follicular Development to Produce Developmentally Competent Bovine Oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 66, 2002, p. 38- 43.

BOELHAUVE, M.; SINOWATZ, F.; WOLF, E.; PAULA-LOPES, F. F. Maturation of Bovine Oocytes in the Presence of Leptin Improves Development and Reduces Apoptosis of In Vitro-Produced Blastocysts. **Biology of Reproduction**, v.73, 2005, p.737-744.

BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CARBONEAU, G.; DUROCHER, J. In Vitro Embryo Production in The Cow: An Effective Alternative to The Conventional Embryo Production Approach. **Theriogenology**, v. 51, 1999, p. 59-70.

BUSH, C.L. A simple solution to media processing. **Laboratory Management**, v.13, 1975, p. 31-48.

CABODEVILA, J. e TERUEL, M. Criopreservacion de Embriones Bovinos. Em PALMA, G. A. **Biología de la reproducción**, Segunda Edición, 2008, p. 271-288.

CARVALHO, F. P.; SILVA, J. F. S.; SOUZA, G. V.; QUIRINO, C. R.; CARVALHO, C.S.P.; Diferentes diluentes sobre a motilidade e integridade de membrana plasmática após o congelamento e descongelamento de sêmen ovino. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.3, Jul./Set., 2008, p. 612-620.

CUTINI, A.; TERUEL, M.; CABODEVILA, J. Factores Que Determinan El Resultado De La Transferencia No Quirurgica de Embriones Bovinos. **Revista Taurus**, 2000, nº 7, p. 28-39 e nº 8, p. 35-47.

DIESEL, T. O. Efeito da Estimulação Ovariana na Quantidade e Qualidade de Ovócitos Obtidos por Aspiração Folicular Transvaginal em Novilhas Nelore. **Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília (UnB) / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília-**

DF, 2010, 81p.

DIEZ, C.; HEYMAN, Y.; LE BOURHIS, D.; GUYADER-JOLY, C.; DEGROUARD, J.; RENARD, J. P. Delipidating In Vitro-Produced Bovine Zygotes: Effect on Further Development and Consequences For Freezability. **Theriogenology**, v. 55, 2001, p. 923-936.

DODE, M. A. N. e RUMPF, R. Produção In Vitro de Embriões na Espécie Bovina: Uma Promissora Ferramenta de Multiplicação Animal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** nº 26, Maio/Junho, 2002, p. 32-27.

DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C.; BUENO, V. G.; ALVES, G. O. Efeito do Tamanho do Folículo na Maturação Nuclear e Citoplasmática de Ovócitos de Fêmeas Zebuínas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, nº 1, Jan., 2000, p. 207-214.

EALY, A. D.; DROST, M.; HANSEN P. J. PHYSIOLOGY AND MANAGEMENT - Developmental Changes In Embryonic Resistance to Adverse Effects of Maternal Heat Stress In Cows, Journal Series Number R-02999 of the Florida Agricultural Experiment Station, **Journal of Dairy Science**, v. 76,1993, p. 2899-2905.

FARIN, P. W.; CROSIER, A. E.; FARIN, C. E. Influence of In Vitro Systems on Embryo Survival and Fetal Development In Cattle. **Theriogenology**, v. 55, 2001, p. 151-170.

FARIN, P. W. e FARIN, C. E.; Transfer of Bovine Embryos Produced In Vivo or In Vitro: Survival and Fetal Development. **Biology of Reproduction** nº 52, 1995, p. 676-682.

FERREIRA, C. R.; SOUZA, G. H. M. F.; FONSÊCA, F. R.; SANVIDO, G. B.; BASSO, A. C.; PONTES, J. H. F.; JÚNIOR J. C. E.; EBERLIN, M. N. Quality Control of Media for In Vitro Bovine Embryo Production Using Direct Infusion Automated Chip-Based Nano-Electrospray Mass Spectrometry. **56th ASMS Conference on Mass Spectrometry**, ID nº 1765, Fev., 2008, 14p.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology** v. 59, 2003, p. 599-616.

GALLI, C. e LAZZARI, G. Practical Aspects of IVM/IVF In Cattle. **Animal Reproduction Science**, nº 42, 1996, p. 371-379.

GIANAROLI, L.; PLACHOT, M.; VAN KOOIJ, R.; AL-HASANI, S.; DAWSON, K.; DEVOS, A.; MAGLI, M. C.; MANDELBAUM, J.; SELVA, J.; VAN INZEN, W. ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories. **Human Reproduction**, v.15, nº 10, 2000, p. 2241-2246.

GORDON, I. Laboratory Production of Cattle Embryos. **Biotechnology in Agriculture Series**, nº 27, segunda edição, 2003, 577p.

GOUVEIA, F. F. A Produção In Vitro de Embriões Bovinos. **Monografia - Universidade de Brasília (UnB)**/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília-DF, Julho, 2011, 35p.

GREEN, R. E. Princípios e Técnicas da Vitriificação de Embriões dos Animais Domésticos. **Monografia** apresentada à disciplina “Seminários I” do programa de **pós-graduação em Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista (UNESP)**/ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu-SP, Março, 2005, 21p.

HENDRIKSEN, P. J. M.; STEENWEG, W. N. M.; HARKEMA, J. C.; MERTON, J. S.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L. A. M.; DIELEMAN, S. J. Effect Of Different Stages Of The Follicular Wave on In Vitro Developmental Competence Of Bovine Oocytes. **Theriogenology** , v. 61, 2004, p. 909-920.

HYTTEL, P.; CALLESEN, H., GREVE, T. Oocyte Growth, Capacitation and Final Maturation in Cattle. **Theriogenology**, v. 47, 1997, p. 23-32.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), BRASIL, 2012.

**Disponível em:** <[http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=2093](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2093)>. Acesso 27/06/12 às 16:41h.

<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=73&z=p&o=32>>. Acesso 28/06/12 às 10:34h.

<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/ca/default.asp?o=2&i=P#4>>. Acesso 28/06/12 às 10:46h.

<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=935&z=p&o=2&i=P>>. Acesso 28/06/12 às 10:55h.

IRELAND, J. J.; MIHM, M.; AUSTIN, E.; DISKIN, M. G.; ROCHE, J. F. Historical Perspective of Turnover of Dominant Follicles During the Bovine Estrous Cycle: Key Concepts, Studies, Advancements and Terms. **Journal of Dairy Science**, v. 83, 2000, p. 1648-1658.

KANE, M. T.; A Review of In Vitro Gamete Maturation and Embryo Culture and Potential Impact on Future Animal Biotechnology. **Animal Reproduction Science**, v. 79, 2003, p. 171-190.

LATIMER, J. M. e MATSEN, J. M. Microwave Oven Irradiation as a Method for Bacterial Decontamination in a Clinical Microbiology Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 6, nº 4, Oct., 1977, p. 340-342.

LE TALLEC, B.; PONSART, C.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B. Risks of transmissible diseases in relation to embryo transfer. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, 2001, p. 439- 450.

LI, H. J.; LIU, D. J.; CANG, M.; WANG, L. M.; JIN, M. Z.; MA, Y. Z.; SHORGAN, B. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, n° 3701, 2008, 10p.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M. P. Factors Influencing Oocyte and Embryo Quality in Cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, 2001, p. 427–437.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M. P. Oocyte and Embryo Quality: Effect of Origin, Culture Conditions and Gene Expression Patterns. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, 2003, p. 259-267.

MACHADO, G.M. Efeito de diferentes protocolos de Percoll na qualidade espermática e na produção in vitro de embriões bovinos. **Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília (UnB)/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília-DF, 2009, 67p.**

MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S. P. Development into Blastocysts of Bovine Oocytes Cryopreserved by Ultra-Rapid Cooling. **Biology of Reproduction**, v. 54, 1996, p. 1059-1069.

MARTINS, C. F. Liofilização de espermatozóides bovinos: viabilidade estrutural e funcional. **Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília (UnB)/ Faculdade de Ciências Biológicas, Brasília-DF, 2006, 110p.**

MCGEE, E. A. e HSUEH, A. J. W. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. **Endocrine Reviews by The Endocrine Society**, v. 21(2), 2000, p. 200-214.

MERTON, J. S.; DE ROOS, A. P. W.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P. L. A. M.; DIELEMAN, S. J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, 2003, p. 651-674.



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA), BRASIL, 2012. **Disponível em:** <<http://www.agricultura.gov.br/politica-agricola/noticias/2012/04/confira-participacao-de-mendes-ribeiro-filho-no-programa>>. Acesso 05/07/12 às 12:34h.

NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L.; TORTORELLA, R. D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, 2010, p.414-421(Supl. Especial).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Manual de Segurança Biológica em Laboratório**, terceira edição, Genebra, 2004. 215p.

PALASZ, A. T. e MAPLETOFT, R. J. Cryopreservation of Mammalian Embryos and Oocytes: Recent Advances. **Biotechnology Advances**, Vol. 14, No. 2, 1996, p. 127-149.

PALMA, G. A. Evaluación de la Calidad de los Embriones. **Biotecnología de la Reproducción**, Segunda Edición, 2008a, p. 237-250.

PALMA, G. A. Transferencia de los Embriones y Comunicación Embriomaterna. **Biotecnología de la Reproducción**. Segunda Edición, 2008b, p. 251-270.

PFEIFER, L. F. M.; PIVATO, I., RUMPF, R.; SARTORI, R.; PEZZINI, T. G.; SILVA JR, E. D.; DIONELLO, N. L.; RABASSA, V. R., TABELÃO, V., CORRÊA, M. N. Influência de Diferentes Níveis de Progesterona na Foliculogênese de Vacas de Corte Submetidas à Punção Folicular. **XIII Congresso de Iniciação Científica e VI Encontro de Pós-Graduação - fazendo sapientias**, Pelotas-RS, 2004.

PFEIFER, L. F. M.; SARTORI, R.; PIVATO, I.; RUMPF, R.; NOGUEIRA, G. P.; XAVIER, E. G.; DIONELLO, N. J. L.; CORRÊA, M. N. Effect of Circulating Progesterone on In Vitro Developmental Competence of Bovine Oocytes. **Animal Reproduction**, v. 6, nº 3, Jul./Sept.,

2009, p. 473-480.

PIVATO, I. Aspiração Folicular em Bovinos - Efeito do BST. **Workshop de Reprodução Animal - Palestras e Resumos** / Embrapa Clima Temperado. Documentos 181, v. 2, Dez., 2006, p. 61-77. Pelotas-RS.

RAHMAN, A. N. M. A.; ABDULLAH, R. B.; WAN-KHADIJAH, W. E. Recovery and Grading of Goat oocytes with Special Reference to Laparoscopic Ovum Pick-Up Technique: A Review. **Biotechnology**, v. 7 (4), 2008, p. 612-622.

REICHENBACH, H. D.; LIEBRICH, J.; BERG, U.; BREM, G. Pregnancy Rates and Births After Unilateral or Bilateral Transfer of Bovine Embryos Produced In Vitro. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 95, 1992, p. 363-370.

SEMPLE, M.E.; BETTERIDGE, K.J.; LEIBO, S.P. Cryopreservation of in vitro-derived bovine embryos produced in a serum-free culture system. **Theriogenology** v. 43, 1995, p. 320.

SIRARD, M. A. Resumption of Meiosis: Mechanism Involved in Meiotic Progression and Its Relation With Developmental Competence. **Theriogenology**, v. 55, 2001a, p. 1241-1254.

SIRARD M. A.; FAERGE, I.; MAYES, M.; HYTTEL, P. Nuclear Ultrastructure in Bovine Oocytes After Inhibition of Meiosis by Chemical and Biological Inhibitors. **Molecular Reproduction and Development**, v. 59, 2001b, p. 459- 467.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES (SBTE) – **Jornal O Embrião**, ano X, edição 42, Jul./Ago., 2009, p. 5-7.

SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (IETS) – IETS 2011 STATISTICS AND DATA RETRIEVAL COMMITTEE REPORT, 2011. **Disponível em:** <<http://www.iets.org/pdf/December2011.pdf>> 10/07/2012 às 15:44.

SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (IETS) – Programa dos Anais da XIX Reunião Anual da SBTE – 2005. **Acta Scientiae Veterinariae**, 33 (Suplemento 1), 2005, 33p.

TAO, J.; TAMIS, R.; FINK, K.; WILLIAMS, B.; NELSON-WHITE, T.; CRAIG, R. The neglected morula/compact stage embryo transfer. **Human reproduction - Oxford journal**, v.17 (6), 2002, p.1513-1518.

VAJTA, G. Vitrification of the Oocytes and Embryos of Domestic Animals. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, 2000, p.357-364.

VAN DE LEEMPUT, E. E.; VOS, P. L. A. M.; ZEINSTRA, E. C.; BEVERS, M. M.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; DIELEMAN, S. J. Improved In Vitro Embryo Development Using In Vivo Matured Oocytes From Heifers Superovulated With a Controlled Preovulatory LH Surge. **Theriogenology**, v. 52, 1999, p. 335-349.

VAN SOOM, A.; BOERJAN, M. L.; BOLS, P. E. J.; VANROOSE, G.; LEIN, A.; CORYN, M.; DE KRUIF, A. Timing of Compaction and Inner Cell Allocation in Bovine Embryos Produced In Vivo after Superovulation. **Biology of Reproduction**, v. 57, 1997, p. 1041-1049.

YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P. E. J.; PRESICCE, G. A. Control of Oocyte Maturation in Cows – Biological Factors. **Theriogenology**, v. 49, 1998, p. 471-482.

ZÚCCARI, C. E. S. N.; CARRIJO, P. R.; LEITE, P. A.; SCALDELAI, P. R. R.; RODOVALHO, N. C. M.; ZANENGA, C. A.; KIEFER, C.; SILVA, E. V. C. Seleção em gradiente de Percoll® sobre os parâmetros espermáticos do sêmen bovino congelado / Selection bovine frozen semen in Percoll® gradient on spermatoc parameters. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, nº 2, Abr./Jun., 2008, p. 358-366.