



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

Diego Barnabé Carneiro

Relatório de Estágio Curricular Supervisionado: Acompanhamento das Atividades do Centro de Transferência de Tecnologia de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira

Relatório de estágio apresentado para a conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Brasília, DF
2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

Diego Barnabé Carneiro

Relatório de Estágio Curricular Supervisionado: Acompanhamento das
Atividades do Centro de Transferência de Tecnologia de Raças
Zebuínas com Aptidão Leiteira

Relatório de estágio apresentado para
a conclusão do Curso de Medicina
Veterinária da Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília

Orientador:
Prof. Dr. Ivo Pivato

Brasília, DF
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Carneiro, Diego Barnabé

Relatório de Estágio Curricular Supervisionado: Acompanhamento das Atividades do Centro de Transferência de Tecnologia de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira. Diego Barnabé Carneiro, orientação de Ivo Pivato – Brasília, 2013.

43 p.:il

Relatório de estágio – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

1. Bovinos . 2. Biotecnologias. 3. Produção de Embriões

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Diego Barnabé Carneiro

Título do Relatório de estágio para Conclusão de Curso: Acompanhamento das Atividades do Centro de Transferência de Tecnologia de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira..

Ano: 2013

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias deste relatório e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte deste relatório pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Diego Barnabé Carneiro

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Autor: Carneiro, Diego Barnabé

Título: Acompanhamento das Atividades do Centro de Transferência de Tecnologia de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira.

Relatório de estágio apresentado para a conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ivo Pivato

Julgamento: _____

Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: _____

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira

Julgamento: _____

Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: _____

Prof. Dr. Carlos Frederico Martins

Julgamento: _____

Instituição: Embrapa

Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, José Roberto Carneiro e Mirian Barnabé, que sempre acreditaram no meu sonho, por todo apoio e carinho para a realização de mais essa conquista.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me abençoado e proporcionado saúde por toda essa trajetória.

A meus pais, José Roberto Carneiro e Mirian Barnabé, que sempre me incentivaram nas minhas escolhas e acreditaram no meu desejo de seguir a profissão de Médico Veterinário.

Ao meu irmão, José Roberto Carneiro Junior que sempre foi um grande companheiro me apoiando por todos esses anos.

Ao meu professor e orientador Dr. Ivo Pivato, pela confiança, os ensinamentos e a sua amizade. Um exemplo a ser seguido na profissão.

Ao Dr. Rodrigo Arruda, por compartilhar seus conhecimentos e por toda a confiança depositada em mim.

Ao Dr. Carlos Frederico e toda a equipe do CTZL, pela oportunidade de estágio e todo aprendizado que me proporcionaram.

A todos os meus amigos, que me acompanharam durante essa caminhada proporcionando momentos felizes e de muita amizade.

A turma XXIV, a melhor turma da Veterinária.

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Fisiologia do ciclo estral	3
2.2. Superovulação	7
2.3. Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	10
2.4. Maturação <i>in vitro</i>	11
2.5. Fecundação <i>in vitro</i>	12
2.6. Cultivo <i>in vitro</i>	14
3. Atividades realizadas	16
3.1. Lavagem e esterilização.....	16
3.2. Rastreamento.....	19
3.3. Fertilização <i>in vitro</i>	21
3.4. Fecundação	21
3.5. Cultivo <i>in vitro</i>	22
3.6. Manipulação Hormonal	23
3.6. Aspiração folicular (AF)	24
3.7. Clonagem.....	25
4. Considerações Finais	27
5. Referências.....	28

1. Introdução

O cenário da pecuária mundial é de constantes evoluções, tanto científicas quanto tecnológicas. O Brasil é responsável por boa parte dessas evoluções, apresentando a todo o momento novos estudos e excelentes resultados em diversas áreas da cadeia produtiva bovina. Em 2012, o rebanho bovino Brasileiro alcançou a cifra de 209 milhões de cabeças, colocando o país como segundo maior produtor de carne bovina do mundo (ABIEC, 2012).

Os estudos na área da reprodução animal contribuíram para sucesso do Brasil no contexto mundial, ajudando a desenvolver e aprimorar as biotecnologias da reprodução animal, que visam aumentar a eficiência reprodutiva e aproveitar o máximo do potencial genético dos animais. A reprodução animal constitui-se num dos fatores de maior importância que afeta diretamente a eficiência e a rentabilidade dos sistemas produtivos (NEVES et al, 2010).

Segundo Bertolini (2009) os avanços biológicos e tecnológicos proporcionaram o desenvolvimento de quatro gerações de tecnologias de reprodução assistida para os animais. A 1º Geração – inclui: Inseminação artificial, criopreservação de gametas e embriões; a 2º Geração compreende: superovulação e transferência de embriões; na 3º Geração encontra-se a sexagem espermática e embrionária, a recuperação de ovócitos e a fertilização *in vitro*; a 4º Geração envolve a clonagem por transferência nuclear de células embrionárias ou somáticas, a transgenia e a biologia de células-tronco. Hoje em dia, a indústria da reprodução animal movimentada no mundo valores em torno de 5 bilhões de dólares (NOGUEIRA et al , 2012).

Atualmente, uma ferramenta da biotecnologia da reprodução que tem despertado interesse é a produção *in vitro* de embriões (PIVE). Os avanços obtidos nas biotecnicas reprodutivas ao longo dos anos permitiram uma maior participação da fêmea bovina no processo de melhoramento genético do rebanho. Isso porque o número de descendentes deixados por uma única fêmea ao longo de sua vida reprodutiva aumentou significativamente com o aperfeiçoamento das técnicas de transferência e produção *in vitro* de embriões, entretanto, uma das principais

desvantagens da PIVE ainda está na baixa produção e qualidade de embriões (GONÇALVES et al., 2007) levando a baixas taxas de gestação após inovulação, além do elevado custo de produção de cada embrião. No ano de 2011 foram produzidos *in vitro* um total 453,471 mil embriões dos quais o Brasil produziu 312,116 mil, sendo destaque e líder mundial nessa área (IETS, 2012).

Um bom exemplo, de sucesso em pesquisas sobre a reprodução animal é a Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. A Embrapa vem investindo no desenvolvimento de técnicas biotecnológicas para estudos de reprodução animal desde a década de 80, com o objetivo de melhorar a eficiência da produção de carne e leite, bem como a conservação de Recursos Genéticos Animais. O Centro de Transferência de Tecnologia de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira (CTZL) é uma unidade da Embrapa, localizada em Brasília que realiza diversos estudos sobre as tecnologias da reprodução animal. O CTZL tem como objetivo, a popularização e difusão de biotecnologias e tecnologias de ponta, melhoramento genético do rebanho zebuíno leiteiro, difusão de raças adaptadas ao ambiente tropical e preservação de espécies ameaçadas de extinção (EMBRAPA).

Baseado nessas informações, este trabalho teve como objetivo principal relatar as principais atividades desenvolvidas no Centro de Transferência de Tecnologia de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira (CTZL) durante o período de abril a julho do ano de 2013, em um total de 480 horas de estagio supervisionado, assim como descrever os procedimentos de duas das principais biotécnicas aplicadas a reprodução animal, a produção de embriões *in vivo* e *in vitro*.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Fisiologia do ciclo estral

O ciclo estral na vaca é caracterizado por modificações cíclicas e morfológicas em seus órgãos reprodutivos e comportamento sexual, tendo duração de 18 a 24 dias, com média de 21 dias (NEVES et al.,2010).Os estudos relacionados à fisiologia e endocrinologia do ciclo estral da vaca foram intensificados a partir do advento da ultrassonografia, no qual se constatou que o padrão de crescimento folicular se dá através de ondas, 2 a 3 por ciclo, (Figuras 1, 2 e 3) (GINTHER et al., 1989). Martins (2007) ressalta que há diferenças entre a dinâmica folicular de *Bos taurus* e *Bos indicus*. Uma das particularidades observadas entre zebuínos e taurinos corresponde ao número de ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral. Estudos realizados mostram que animais da raça Holandesa demonstraram predominância de duas e três ondas de crescimento folicular por ciclo estral de acordo com Sávio et al. (1988) . Em zebuínos estudos apresentam maior incidência de ocorrência de 3 ondas foliculares, podendo ser observada a presença de até 4 ondas de crescimento folicular por ciclo estral de acordo com (RHODES et al.,1995). O conhecimento desses eventos permitiu e esclareceu vários pontos da endocrinologia do ciclo estral.

Durante o ciclo estral ocorrem importantes alterações no córtex ovariano que incluem crescimento e atresia de vários folículos antrais até o aparecimento do folículo ovulatório, bem como a formação e lise do corpo lúteo (CASTILHO, 1999). O crescimento folicular na espécie bovina exhibe padrão contínuo de crescimento e atresia dos folículos ovarianos (MATTON, et al., 1981; WOOLUMS; PETTER, 1994) que se inicia na vida fetal, passa pela puberdade (EVANS, et al., 1997) e continua na vida reprodutiva até a senilidade (HAFEZ, 1993).

Este processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos, que leva ao crescimento do folículo pré-ovulatório, é conhecido como dinâmica folicular, enquanto que o padrão de crescimento e atresia de um grupo de folículos ovarianos é denominado onda de crescimento folicular (LUCY, et al., 1992). Cada onda de crescimento folicular é dividida em quatro fases: emergência, seleção, dominância e atresia ou ovulação. A emergência de uma onda é caracterizada por um crescimento de mais de 20 folículos pequenos que são estimulados pelo FSH (REIS, 2004). A

concentração de FSH atinge seu pico quando o maior folículo denominado dominante (FD) atinge o tamanho de 4 a 5 mm (NASSER, 2006).

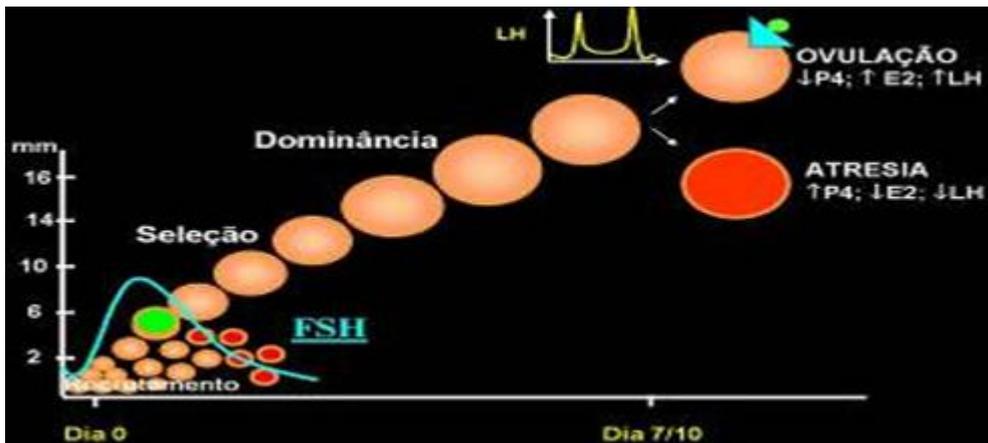


Figura 1: fases do Crescimento Folicular bovino em uma onda.
Fonte: Tecnopec

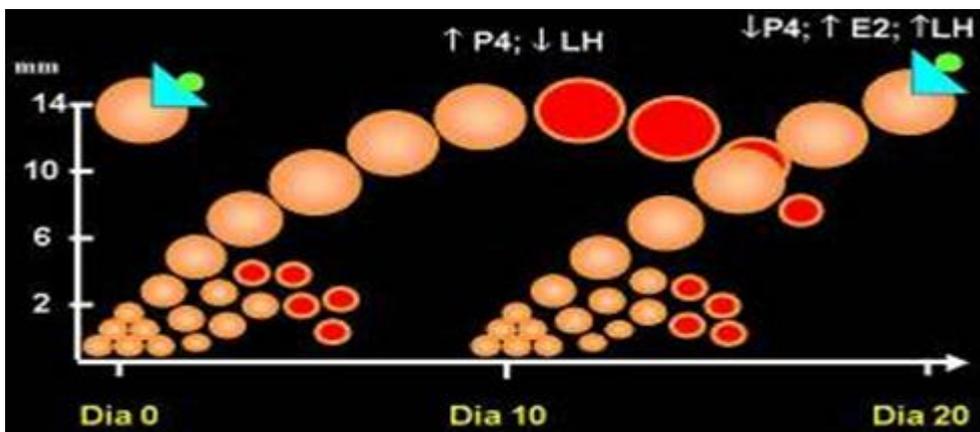


Figura 2: Fases de crescimento folicular bovino com 2 ondas
Fonte: Tecnopec

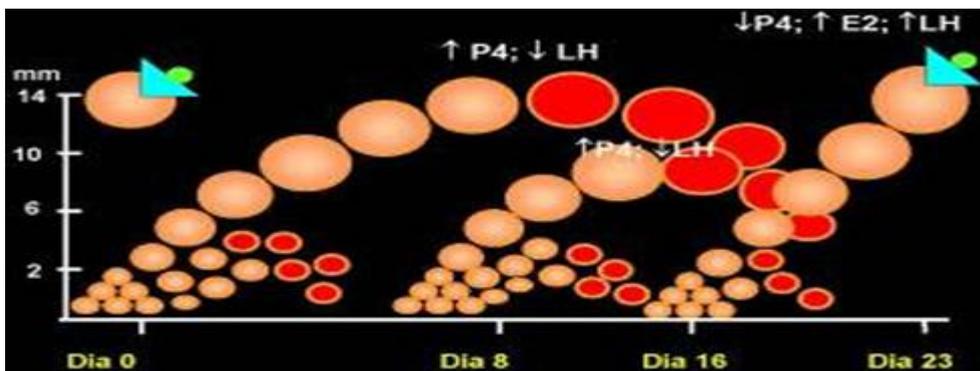


Figura 3: Fases de crescimento folicular bovino com 3 ondas.
Fonte: Tecnopec

O ciclo estral é regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos que são os hormônios hipotalâmicos, as gonadotropinas produzidas pela adenohipófise e os esteroides secretados pelos ovários. O controle da secreção das gonadotropinas durante o ciclo estral exige um delicado balanço entre as complexas interações hormonais. Núcleos hipotalâmicos secretam GnRH, que através de um sistema circulatório especial, chamado sistema porta hipotalâmico-hipofisário, estimulam a adenohipófise a secretar o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH), que via corrente circulatória promovem a síntese de estrógeno e progesterona pelos ovários. Estes dois últimos exercem influência, através de mecanismos de feedback positivo ou negativo, diretamente na hipófise ou no hipotálamo, tornando possível a continuidade dos eventos cíclicos que caracterizam o ciclo estral (HAFEZ, 2004).

Os hormônios estradiol (E2) e progesterona (P4) são produzidos pelas estruturas do ovário (folículo e corpo lúteo, respectivamente) e estão ligados à manifestação do cio e manutenção da gestação (VALLE,. 1991).

O período de desenvolvimento folicular, ou fase folicular, pode ser dividido em proestro e estro. O período de proestro, com duração de dois a três dias, é caracterizado pelo declínio nos níveis de progesterona, pelo desenvolvimento folicular e pelo aumento dos níveis de estradiol no sangue. Nessa fase, a liberação do GnRH pelo hipotálamo estimula a secreção de FSH e LH da glândula pituitária. Os elevados níveis de FSH no sangue induzem o desenvolvimento dos folículos e, em sinergismo com o LH, estimulam a sua maturação. À medida que o folículo se desenvolve, aumenta a produção de estradiol pelos mesmos, e após uma determinada concentração, o estradiol estimula a manifestação do cio e a liberação massiva do LH, dando início à segunda fase, cuja duração varia de 6 a 18 horas. No período de estro, a ocorrência de elevados níveis de estradiol, além de induzirem a manifestação do cio, são também responsáveis pela dilatação da cérvix, síntese e secreção do muco vaginal e o transporte dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino. Durante o período de manifestação do cio, a vaca ou novilha fica inquieta, monta e deixa-se montar por outras vacas, reduz o apetite, diminui a produção de leite e apresenta corrimento muco vaginal claro e viscoso (VALLE,.1991)

Após o término da manifestação do cio, tem início o período de desenvolvimento do corpo lúteo, ou fase luteínica. A fase luteínica pode ser

subdividida em metaestro e diestro. O metaestro, com duração de dois a três dias, tem como característica principal a ovulação que é a liberação do óvulo pelo folículo. Em bovinos, a ovulação ocorre geralmente de 12 a 16 horas após o término do cio. Após a ruptura do folículo as células da parede interna do folículo se multiplicam dando origem a uma nova estrutura, denominada corpo lúteo ou corpo amarelo. O corpo lúteo produz progesterona, que é o hormônio responsável pela manutenção da gestação. O diestro se inicia quando o CL está formado e se mantém em pleno funcionamento. Há o aumento da concentração de Progesterona (P4) até o 12º dia do ciclo quando então se estabiliza e se mantém até o 17º dia do ciclo. A partir daí há o declínio brusco dessa concentração pela ação da Prostaglandina (PGF 2 α) (ALBUQUERQUE et al., 2004).

A emergência da primeira onda folicular é observada em torno de um dia e meio após a ovulação (ADAMS, et al., 1992; GINTHER, et al., 1997) quando um conjunto de folículos antrais dependentes de FSH começa a se desenvolver. Foi observado um aumento na concentração plasmática de FSH que antecede 1 a 2 dias a emergência de cada onda folicular (ADAMS, et al., 1992; GIBONS; GINTHER, 1999). Em torno de 3 a 4 dias após a emergência da onda, o FSH reduz para níveis basais e o futuro folículo dominante é selecionado, continua seu crescimento, enquanto o restante dos folículos detém seu crescimento ou regride e são chamados de subordinados (GINTHER, et al., 2000). Cada onda é caracterizada pelo crescimento simultâneo de cinco a sete folículos antrais de um “pool” de folículos >5mm, sendo que um destes cresce mais rapidamente enquanto os outros regredem. Esse folículo continua seu crescimento até atingir o diâmetro de aproximadamente 15mm em taurinos, permanecendo com este tamanho por dois a três dias antes da regressão, quando então se inicia uma nova onda de desenvolvimento. Se a fase de crescimento coincide com a luteólise, o folículo sofre uma rápida maturação pré-ovulatória e a ovulação (HAFEZ, 2004).

O completo mecanismo da dominância folicular ainda não está totalmente esclarecido, porém sabe-se que vários fatores de crescimento estão envolvidos neste processo complexo e não somente as gonadotrofinas como o LH e FSH (NEVES et al., 2010). Nas diferentes fases do ciclo estral, existe nos ovários um número de folículos entre 200 e 400 que se encontra em fase de crescimento; destes, 25 a 50 são folículos terciários, dos quais 1 será selecionado como folículo dominante, adquirindo características para realizar a maturação e a ovulação (Prado

et al., 2007). No folículo dominante, o crescimento em dimensão e o aumento da produção de estradiol são acompanhados por uma diminuição nos níveis de inibina, ativina e IGFBP (proteínas ligadoras do fator de crescimento semelhante à insulina) e aumento do IGF-1 livre (FORTUNE et al., 2001). O IGF-1 é capaz de estimular a proliferação e diferenciação das células da granulosa e o aparecimento de receptores de LH nestas células (ARMSTRONG et al., 1996; SPICER & STEWART, 1996). Depois de estabelecida a dominância, se os níveis de P4 estiverem altos, inibindo assim a pulsatilidade do LH, o folículo dominante não irá ovular e entrará em atresia, iniciando uma nova onda folicular (ADAMS et al., 1992). Entretanto, quando os níveis de P4 estão baixos pela regressão luteal, o folículo dominante tem seu crescimento terminal, liberando maiores quantidades de E2 para circulação sanguínea. O E2, através do feedback positivo, estimula os picos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e conseqüentemente de LH, levando à ovulação (GINTHER et al., 2001). Caso não ocorra fecundação a PGF2 α (Prostaglandina F2 α) é liberada pelo útero levando à luteólise e um novo ciclo se iniciará.

2.2. Superovulação

A utilização de fármacos na área reprodutiva, mais especificamente os hormônios, sofreu progresso significativo na última década, de modo que, atualmente, eles são intensamente estudados. Mediante os fármacos é possível incrementar os índices reprodutivos dos rebanhos de corte e de leite, utilizando-se a hormonioterapia, tanto para o tratamento individual, no caso das afecções ovarianas, quanto o de rebanhos, como, por exemplo, programas de inseminação artificial ou mesmo de superestimulação ovariano em animais de elevado valor genético e que, evidentemente, deve ser otimizado o seu aproveitamento (KOZICKI et al., 2005).

O tratamento para superovulação (SOV) é um procedimento fundamental para a obtenção de múltiplos embriões em bovinos, sendo os resultados diretamente relacionados ao número e qualidade de estruturas obtidas (GEARHEART et al., 1989). A SOV é o aumento do número fisiológico de ovulações, próprio de cada espécie, provocado através da administração exógena de gonadotrofinas. Nos bovinos, considera-se que houve resposta ao tratamento quando se consegue mais

de duas ovulações (PFEIFER et al., 2005). A SOV, portanto, é um método de estimular diversos folículos terciários a se desenvolverem até o estágio de pré-ovulação, com subsequente ovulação (RASI, 2005). Os tratamentos com a utilização de diferentes hormônios estão sendo testados e comparados. A finalidade é encontrar o melhor protocolo que possa ser empregado em maior escala, com menores custos e com resultados eficientes. Entre os agentes superovulatórios mais testados está a gonadotrofina coriônica equina (eCG), que, na década de 1970, foi a principal gonadotrofina utilizada (ROWSON et al., 1972; BOLAND et al., 1978; ALFURAJI et al., 1993). Possui efeito semelhante ao FSH, apresenta a conveniência de aplicação única, devido a sua meia vida longa (GEARHEART et al., 1989), mas os resultados são muito heterogêneos, com elevada incidência de cistos e de embriões degenerados (ARMSTRONG et al., 1994).

O hormônio mais utilizado a partir da década de 1980 foi o hormônio folículo estimulante (FSH) extraído da pituitária de suínos, ovinos e equinos (DONALDSON, 1989)

Os primeiros protocolos utilizados em bovinos eram mais difíceis de serem empregados, pois, dependiam de uma rigorosa observação do ciclo estral, já que o momento da aplicação dos hormônios interfere diretamente nos resultados dos programas de estimulação ovariana.

A aplicação do FSH pode ser realizada mediante aplicação seriada no início da 2ª onda folicular, ou seja, entre os dias 9 a 12 do ciclo estral (GOULDING, et al., 1990). A resposta ovariana a superovulação depende do número de folículos sensíveis à gonadotrofina presentes no ovário e do estágio da onda folicular no momento em que a aplicação de FSH é iniciada (DRIANCOUT, 2001).

Os estudos realizados buscam novas alternativas que facilitem essa manipulação do ciclo estral. A onda de desenvolvimento folicular em bovinos pode ser controlada mecanicamente por ablação do folículo com auxílio da ultrassonografia, ou quimicamente pelos tratamentos com GnRH ou estradiol e progesterona em combinação (BÓ et al., 2003). Um procedimento comumente utilizado quando se manipula o ciclo estral é a aspiração do folículo dominante com auxílio de um ultrassom (BARROS et al., 2006; BURATINI et al., 2000; DE ROOVER et al., 2008; MONTEIRO et al., 2009). Assim, um folículo que está destinado a regredir, muda seu curso no prazo de 12 horas após a remoção do futuro folículo

dominante (BEG et al., 2002). A associação da P4 ao E2 no início do protocolo faz com que haja uma retroalimentação negativa no hipotálamo-hipófise, com isso levando uma atresia dos folículos ovarianos. Entretanto, com uma média de 3 a 4 dias, o E2 é metabolizado, e com isso se dá início a uma nova onda de desenvolvimento folicular (RYAN et al., 1995).

Sá Filho et al. (2006) avaliaram o efeito da administração no D0 de 2mg de benzoato de estradiol (BE) ou de 5mg de Valerato de estradiol (VE) mais 3mg de Norgestomet ou $\frac{1}{2}$ dose de Valerato de estradiol ($\frac{1}{2}$ VE) no início do tratamento com implante auricular de Norgestomet na sincronização da emergência da onda folicular em vacas e novilhas *Bos indicus*. Observaram efeito significativo no intervalo e na dispersão do momento da emergência da nova onda de crescimento folicular entre os tratamentos. A média de emergência foi de 2,5; 4,2; 6,1 dias para BE, $\frac{1}{2}$ VE e VE respectivamente para novilhas. As vacas apresentaram média de emergência de 2,5; 3,1; 4,0 dias para BE, $\frac{1}{2}$ VE e VE respectivamente.

A forma de aplicação do FSH também é muito discutida. Os primeiros protocolos recomendavam a administração de um tratamento com doses múltiplas, e aplicação 2 vezes ao dia. O processo de estímulo ovariano para produção de múltiplos folículos requer uma série de 2 injeções por 4-5 dias, devido a meia vida curta do hormônio (EISDEN et al., 1976; DEMOUSTIER et al., 1988). O método tradicional de aplicação do hormônio FSH é mais eficaz que o de uma dose única, mas se adicionado a um agente que promova a liberação do hormônio lentamente os resultados podem ser bastante interessantes (TRIBULO et al., 2011). A vantagem da aplicação de uma única dose é diminuir o manuseio dos animais, assim, atenuando o estresse dos mesmos.

Alguns estudos foram realizados para comparar os diferentes métodos de aplicação do FSH. O trabalho de Tribulo et al. (2011) comparou alguns métodos, e apresentou resultados satisfatórios utilizando a fórmula de liberação lenta do FSH. Neste experimento os pesquisadores testaram 3 protocolos, e verificaram que tratamentos com doses mais elevadas de FSH resultou em maiores produções de embriões e que não existe diferença entre o tratamento com dose única e o tradicional. Lovie et al. (1994), citaram que a região onde é aplicado o hormônio também influencia nos resultados. Um local com espessura de gordura subcutânea

maior apresentou resultados mais satisfatórios em comparação com regiões de menor espessura de gordura.

A desvantagem da administração do FSH é o seu período de meia vida muito curta, mas a fórmula de liberação lenta utiliza agentes que proporcionam uma liberação gradativa do hormônio. Estes agentes são geralmente polímeros, são biodegradáveis e não reativos para os tecidos, facilitando a utilização em animais (Sutherland, 1991). Tríbulo et al. (2011), utilizaram como diluente em seus estudos o ácido hialurônico. O ácido hialurônico é uma glicosaminoglicana encontrado no útero, tecido conjuntivo, epitelial e nervoso, desempenha importante função na célula (BERGGVIST et al., 2005).

As eficiências dos protocolos de superovulação não dependem apenas dos tratamentos escolhidos, é preciso observar outros fatores que influenciam nos resultados. O escore corporal dos animais, o momento do ciclo estral que foi iniciado o tratamento, a sanidade do rebanho e a mão de obra utilizada.

Rodrigues (2012) ressalta, que a introdução de esquemas de ovulações múltiplas, recuperação e transferência de embriões, mais conhecido como Multiple Ovation and Embryo Transfer (MOET), junto com a criopreservação de embriões na década de 80, a bovinocultura passou a ter ferramentas para aumentar o número de gestações de fêmeas com alto mérito genético.

Após a SOV, as doadoras são inseminadas e a coleta dos embriões é realizada aos 7 dias. Estes embriões poderão ser congelados ou transferidos para o útero de receptoras, que levarão a gestação a termo.

2.3. Produção *in vitro* de embriões

Produção *in vitro* de embriões é uma biotécnica da reprodução essencial para pecuária moderna. As diversas vantagens e aplicações da produção *in vitro* de embriões (PIVE) estão relacionadas à: determinação e controle do sexo dos produtos; aumento da eficiência dos programas de produção; rápidas e melhores possibilidades para executar programas de cruzamento; avaliação do efeito materno sobre a descendência; rápida multiplicação de raças; facilidade de importação e exportação de material genético da fêmea; formação de bancos de gametas congelados; aumento da eficiência do sêmen congelado de alto valor genético; e

estudo e desenvolvimento de outras biotécnicas reprodutivas a partir da micromanipulação de gametas e embriões (GONÇALVES et al., 2002).

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) expandiu-se nas diferentes espécies animais pouco tempo após o nascimento de Louise Brown em 1978, na Inglaterra, o primeiro bebê de proveta do mundo (STEPTOE e EDWARDS, 1978). Em 1982, nasceu o primeiro bezerro bovino produzido por fecundação *in vitro* nos Estados Unidos (BRACKETT et al., 1982).

A PIVE vem sendo gradativamente incorporada nos programas de melhoramento animal, como técnica de multiplicação, sendo que seu uso vem aumentando significativamente no país. De fato, o Brasil hoje ocupa uma posição de destaque no cenário mundial com conseqüente reconhecimento internacional, sendo responsável por quase 50% da produção mundial de embriões *in vitro* (NEVES et al., 2010).

A PIVE compreende um conjunto básico de tecnologias de reprodução que envolve a obtenção de ovócitos imaturos de folículos ovarianos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) de embriões (KANE, 2003).

2.4. Maturação *in vitro*

A maturação do ovócito envolve transformações nucleares e citoplasmáticas e está ligada a uma série de mudanças estruturais e bioquímicas que tornam o gameta feminino apto a ser fecundado e ter desenvolvimento embrionário subsequente (RENESTO et al, 2004). As décadas de 60 e 70 foram muito importantes para a PIVE, o conhecimento sobre as transformações no estágio de maturação ovocitaria impulsionaram a utilização da técnica. A cinética da maturação nuclear de ovócitos bovinos foi estudada por Sirard et al. (1989). Os tempos transcorridos em cada fase a partir da MIV foram os seguintes: de 10,3 a 15,4 horas em Metáfase I, de 15,4 a 16,6 horas em Anáfase I, de 16,6 a 18 horas em Telófase I e de 18 a 24 horas em Metáfase II. Da mesma forma, Wehrend e Meinecke (2001) encontraram tempos próximos ao descrito. Por esta razão, o tempo de cultivo mais utilizado para maturação *in vitro* é de 24 horas. A maturação inadequada, seja do núcleo ou do citoplasma, inviabiliza a fecundação e aumenta a ocorrência de polispermia, de partenogênese e de bloqueio do desenvolvimento embrionário

(MINGOTI, 2005). Em condições *in vivo* a maturação tem início logo após o pico pré-ovulatório de LH enquanto que no caso da aspiração folicular, este processo se inicia logo após a remoção do ovócito do interior do folículo ovariano (GARCIA, 2004).

Diferentes condições de cultivo e protocolos já foram testadas *in vitro* para a maturação de ovócitos e vários meios de maturação, tais como fluido sintético de oviduto (SOF; GANDHI et al., 2000;), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Ham's F-10, Ham's F-12 (SMETANINA et al., 2000) e meio de cultivo tecidual 199 (TCM 199), têm sido utilizados. A grande maioria dos laboratórios tem optado pela suplementação do meio de maturação com soro fetal bovino (SFB) e gonadotrofinas (FSH, LH e Estradiol), em condições controladas de atmosfera e temperatura (NAGAI., 2001).

Segundo (ANTONIOLLI, 2005), o processo de produção *in vitro* de embriões envolve diversas etapas críticas, dentre elas a maturação *in vitro* propriamente dita. Todas as variáveis anteriores à maturação *in vitro* tais como a manutenção da temperatura no transporte dos ovários, o tempo entre o abate e o início do procedimento de aspiração folicular, o tamanho do folículo, os estágios de desenvolvimento dos ovócitos, o diâmetro e homogeneidade dos ovócitos e COCs (complexos cumulus-ovócitos), a composição do meio MIV e os hormônios podem alterar significativamente os resultados de produção.

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

A MIV é realizada em incubadoras ou estufas com atmosfera de 5% de CO₂ em ar, 38°C de temperatura e umidade saturada.

2.5. Fecundação *in vitro*

Até a década de 40, o conhecimento sobre a fecundação *in vitro* era baseado no estudo de ovócitos de estrelas do mar. Os invertebrados marinhos foram primeiramente utilizados na pesquisa, porque, ao contrário dos mamíferos, a fecundação ocorre externamente ao sistema reprodutor da fêmea (Gonsalves et al.,

2002). Embora o primeiro estudo relativo à fecundação em mamíferos tenha ocorrido em 1935 (PINCUS e ENZMANN, 1935), até a década de 50 praticamente nenhum sucesso tinha sido obtido. Austin (1951) e Chang (1951) observaram que, quando os espermatozoides eram depositados no trato reprodutivo da coelha logo após o momento da ovulação, poucos ovócitos eram fecundados. Por outro lado, uma proporção muito grande de gametas era fecundada quando a inseminação ocorria na tuba uterina várias horas antes da ovulação (AUSTIN, 1951; CHANG, 1951). Foi postulado que os espermatozoides de algumas espécies mamíferas necessitavam de algum tempo no trato reprodutivo feminino antes de adquirir a capacidade de penetrar nos ovócitos. Este conjunto de mudanças foi denominado de capacitação espermática.

A capacitação dos espermatozoides envolve diversas reações bioquímicas e mudanças estruturais da membrana plasmática. 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 (zona pelúcida), facilitando a posterior fusão dos pronúcleos dos gametas envolvidos. Para que essa alteração estrutural *in vitro* aconteça são adicionados agentes capacitadores como a heparina e o cálcio ionoforo (ASSUMPCAO et al., 2002).

A fertilização é realizada em temperatura de 39°C, atmosfera com 5% de CO₂ e umidade saturada. Os espermatozoides viáveis contidos em uma palheta de sêmen precisam ser separados do plasma seminal, crioprotetores, extensores e dos espermatozoides mortos antes de serem co-cultivados com os ovócitos. Em bovinos, os métodos de separação espermática mais utilizados são o gradiente de PERCOLL e o swim-up. Após a separação, os espermatozoides são diluídos numa concentração de 1 a 5 x 10⁶ espermatozoides/ml de meio (GONÇALVES et al., 2007). Devido a maior porcentagem de espermatozoides móveis recuperados e o menor tempo necessário para sua realização, o método de Percoll é o mais utilizado para a preparação de espermatozoides bovinos a serem utilizados na FIV (PARRISH et al., 1995). Em relação aos laboratórios, os sistemas de cultivo utilizados para fecundação *in vitro* apresentam muitas diferenças. No entanto, é imprescindível que o meio empregado seja capaz de propiciar ao ovócito secundário e ao espermatozoide condições ideais para que a penetração ocorra da forma mais rápida possível (GORDON, 1994).

Os espermatozoides necessitam estar capacitados para se ligarem aos receptores ZP3 na zona pelúcida (ZP) do ovócito (Silva, 1998) e, então sofrerem a reação do acrossoma e ultrapassarem a zona. Após passarem pela ZP esses chegam ao espaço perivitelínico, se ligam à membrana plasmática do ovócito e são incorporados ao ooplasma. Após a fusão do espermatozoide com o ovócito, ocorre a ativação, evidenciada na maioria dos mamíferos pela exocitose dos grânulos corticais e retomada da meiose. O núcleo espermático se descondensa e se transforma no pronúcleo masculino. O pronúcleo migra para o centro do ovócito, o envelope nuclear se desintegra e ocorre a associação dos cromossomos com o pronúcleo feminino para a primeira divisão mitótica, a clivagem. Conseqüentemente inicia-se o desenvolvimento embrionário por sucessivas divisões e alterações morfológicas para a formação de mórulas e blastocistos (YANAGIMACHI, 1994).

O tempo de co-incubação dos ovócitos e espermatozoides pode variar de 6 a 24 horas de acordo com os protocolos utilizados pelos laboratórios (GARCIA et al., 2005; MINGOTI, 2005). Atualmente, o processo de fecundação *in vitro* na espécie bovina é o que apresenta maior sucesso dentre todas as espécies, sendo que 40% ou mais dos ovócitos maturados e fecundados *in vitro* podem se desenvolver até blastocisto, e muitos bezerros já nasceram após a utilização destas técnicas (HASLER, 1998; BAVISTER, 2002).

2.6. Cultivo *in vitro*

Após o maior entendimento do processo de fecundação em mamíferos, meios capazes de favorecer o crescimento embrionário até o estágio de blastocisto começaram a ser desenvolvidos. Em 1967, um primeiro trabalho demonstrou que zigotos de rata evoluíam até o estágio de duas células embrionárias na presença de lactato e piruvato (WHITTEN e BIGGERS, 1967). Um ano depois, obtiveram desenvolvimento de embriões em um meio simples, sem o aporte de substâncias macromoleculares de origem materna (WHITTEN e BIGGERS, 1968). No entanto, durante o cultivo, muitos embriões paravam o desenvolvimento entre duas e 16 células dependendo da espécie estudada. Anos mais tarde esta parada foi denominada de bloqueio do desenvolvimento embrionário, que corresponde até hoje a uma resposta embrionária aos efeitos adversos ou carências do sistema de

produção no momento da transição do genoma materno para o embrionário (BARNNES e EYSTONE, 1990; PETTERS, 1992). Na espécie bovina, os embriões sofrem bloqueio no estágio de oito células, ou seja, no 4º ciclo celular (SMITH et al., 1995).

Devido ao sucesso destes trabalhos e a grande dificuldade em transpor o bloqueio sofrido pelos embriões bovinos no estágio de oito células, pesquisadores de todo o mundo passaram a cultivar os embriões utilizando tuba uterina de diferentes espécies animais incluindo camundongos, coelhos, ovelhas e até mesmo ovos de galinha (GORDON, 1975; FEHILLY et al., 1984; PAPAIAONNOU e EBERT, 1986; BLAKEWOOD e ZHANG, 1993). O conhecimento sobre esses eventos possibilitou a avaliação das propriedades da tuba uterina, e necessidades dos embriões no início do seu desenvolvimento, assim métodos alternativos foram desenvolvidos para facilitar a produção *in vitro* (GORDON 1994).

Após a FIV, os possíveis zigotos são transferidos para o meio de cultivo onde permanecem até atingirem o estágio de blastocisto. O meio mais utilizado atualmente é o meio líquido sintético do oviduto (SOF), entretanto vários outros tem sido utilizados tais como meio de cultivo celular 199 (TCM-199), meio Ham's F-10, CR1 e CR2, suplementados com proteínas, substâncias energéticas, aminoácidos essenciais e não essenciais. Em geral, os meios utilizados para o cultivo embrionário são suplementados com uma fonte proteica tal como soro fetal bovino (SFB), soro sintético quimicamente definido (SSS), albumina sérica bovina (BSA) ou as macromoléculas como álcool polivinílico (PVA) ou polivinilpirrolidona (PVP) (DIESEL, T. 2012).

O desenvolvimento embrionário é marcado pela primeira clivagem, a ativação do genoma embrionário no estágio entre 8 e 16 células, a compactação da mórula e a formação do blastocisto entre os dias 6 e 7 após a FIV. Nesse estágio os embriões podem ser transferidos para o útero de fêmeas receptoras que levarão a gestação a termo (DODE & RUMPF, 2002). Outra alternativa para os embriões produzidos seria a criopreservação, entretanto as técnicas de criopreservação ainda estão em fase de aprimoramento, buscando desenvolver melhores protocolos, seja no congelamento clássico ou na vitrificação. Os resultados de gestação ainda são bastante instáveis.

3. Atividades realizadas

3.1. Lavagem e esterilização

O laboratório de lavagem e esterilização (LLE) é local para onde são destinados todos os utensílios e equipamentos utilizados na rotina do CTZL. Esses materiais encaminhados para o LLE são os utilizados para o serviço de campo e também os que foram usados nos laboratórios. O LLE dispõe de 2 estufas, 1 autoclave, 1 microondas, 1 cuba de 20 litros para imersão do material de uso geral, 1 cuba de 20 litros para imersão de material da FIV, 3 baldes de 8 litros, 1 destilador e 1 seladora.

Todos os materiais que chegam ao LLE são armazenados em seus respectivos recipientes, ou seja, um para o material de uso geral e outro para a FIV. Os materiais são lavados no LLE da seguinte forma:

- Primeiramente é colocada a água dentro da cuba onde estão os materiais, a quantidade indicada é a necessária para deixar todos os materiais completamente imersos. Depois é despejado um detergente (Extran 2%) para a limpeza química, a quantidade de detergente utilizado é de acordo com a quantidade de água dentro das cubas.

- O material fica imerso por 2 dias na solução contendo detergente, para limpeza química e retirada de boa parte dos resíduos presentes.

- Após a limpeza química é realizada uma limpeza mecânica, com auxílio de uma esponja e de escovas. Essa limpeza mecânica é feita para retirada do restante de resíduos ainda presentes.

- Executado a limpeza mecânica todo material é enxaguado em água corrente e colocado em escuradores para retirar o excesso de água.

- Para uma completa remoção de resíduos todo material é ainda enxaguado por 3 vezes em água destilada. Esse procedimento é indicado, pois qualquer resíduo de sujidades ou químicos podem colocar em risco os procedimentos realizados.

- Depois dos 3 enxágues em água destilada o material é colocado dentro das estufas onde ficará por no mínimo 2 dias para a completa secagem.

Todo procedimento de lavagem deve seguir uma ordem, primeiro realiza-se a lavagem e o enxágüe (água corrente e os 3 banhos de água destilada) do material da FIV em seguida é feito o mesmo procedimento do material de uso geral. Essa ordem é seguida, pois o material da FIV exige um cuidado e uma higienização mais rigorosa.

O material que já está seco é retirado das estufas para que possa ser embalado para realização da esterilização. Com auxílio de uma máquina seladora todo material é acondicionado em embalagens plásticas. Os materiais são embalados individualmente (seringas, filtros coletores, pipetas e vidrarias) ou em grupos de 4 ou 5 (placas e tubos).

A esterilização é feita com os materiais já embalados, com auxílio da autoclave todo material que suporta pressão e temperaturas de 120°C são esterilizados e alguns tubos e placas de plástico que não suportam estas condições são esterilizados em microondas. Os materiais ficam dispostos dentro do microondas em volta de um Becker contendo água destilada, o tempo mínimo para a correta esterilização é de 5 minutos. Após o procedimento todas as embalagens são identificadas e datadas.

A rotina do LLE segue como apresentado na tabela 1, mas podem acontecer algumas mudanças, pois os trabalhos e experimentos podem mudar o seu dia de realização e assim acumular mais ou menos quantidade de materiais para serem lavados.

Tabela 1- Rotina do Laboratório de lavagem e esterilização

Rotina do LLE	
Segunda	Retirar o material de dentro das estufas, embalar e esterilizar
Terça	Trocar a água dos baldes contendo água destilada
Quarta	Limpeza química dos materiais
Quinta	Limpeza química dos materiais
Sexta	Limpeza mecânica dos materiais e secagem

A limpeza dos laboratórios é realizada todos os dias, os pisos são higienizados com produtos específicos para remoção de matérias orgânicas e microrganismos presentes no ambiente. Todos os laboratórios possuem um acesso restrito, para prevenção de possíveis contaminações de agentes químicos ou biológicos. As pessoas que trabalham dentro dos laboratórios também necessitam de uma rigorosa assepsia, por isso é necessário executar a correta higienização das

mãos com água, detergente e álcool 70%, o jaleco deve estar limpo e seu uso deve ser pessoal, também são usados calçados exclusivos para o laboratório.

O CTZL utiliza varias biotécnicas da reprodução, com o objetivo de aprimorar protocolos que já são utilizadas no mercado, criar novos para que possam aumentar os índices de produção embriões, facilitar transferência de genética de animais superiores e garantir a preservação de animais ameaçados de extinção.

As atividades acompanhadas durante o período de estágio foram principalmente relacionadas com as biotecnologias da reprodução, onde tive a oportunidade de aprender e praticar. As biotécnicas acompanhadas durante o período de estágio foram realizadas a campo, e nos laboratório de criopreservação e análise de sêmen (LCAS), Laboratório de produção e transferências de embriões (LPTE) e Laboratório de Micromanipulação (LM). As técnicas acompanhadas foram: Inseminação Artificial, transferência de embriões, palpação retal para diagnostico de prenhez, manipulação hormonal, utilização de ultrassom (diagnostico gestacional e controle folicular), produção de embriões.

Para realização dos estudos desenvolvidos, ovários bovinos, oriundos de abatedouros locais eram encaminhados ao laboratório de (LCAS). A coleta desse material é feita de preferência no período diurno e segue algumas exigências para conservação e integridade dos ovários/ovócitos. Após a coleta os ovários devem ser conservados em recipiente de vidro estéril contendo solução salina 0,9% previamente aquecida, o transporte é feito em uma caixa térmica contendo água entre 34°C e 37°C. Esse procedimento deve ser seguido desde o momento da coleta do material até a chegada ao laboratório.

No laboratório o recipiente com os ovários é colocado em banho-maria a 37°C, e permanece até o termino da aspiração (figura 5). Os folículos devem ser aspirados o mais rápido possível dos ovários. A aspiração é realizada com auxilio de uma seringa de 20ml acoplada a uma agulha 40x12 ou utilizando uma bomba de vácuo com pressão de aspiração adequada. A aspiração deve seguir a linha de folículos, a agulha não pode aprofundar muito no tecido ovariano e somente folículos com tamanho entre 3mm e 8mm devem ser aspirados.

O líquido aspirado é transferido para tubos estéreis de 10ml, permanecendo em banho Maria a 37°C por alguns minutos para que ocorra a sedimentação dos ovócitos e outros tipos celulares.



Figura 5: Ovários bovinos coletados em abatedouros
Fonte: Diego B. Carneiro .

3.2. Rastreamento

O sedimento do tubo de coleta é depositado numa placa de Petri sobre uma tampa riscada e a identificação e busca dos ovócitos é realizada em lupa estereoscópica. Os ovócitos são visualizados e coletados com auxílio de uma pipeta. À medida que os ovócitos são encontrados, são classificados quanto a qualidade e levados para uma placa pequena contendo meio de lavagem (LAV) sobre placa aquecedora. São selecionados apenas ovócitos de qualidade 1 e 2, os quais são considerados aptos ao processo de maturação, fecundação e desenvolvimento. O tempo limite para realização desse procedimento é de 45 minutos. Em seguida, realiza-se a lavagem dos ovócitos em gotas de 100 μ L de meio de maturação in vitro (MIV). Após lavagem as estruturas são transferidas para outra placa com gotas de 100 μ L de MIV coberto com óleo mineral (preparada previamente e estabilizada em estufa). Normalmente são colocadas 20 estruturas por gota. Posteriormente coloca-

se para maturar em estufa a temperatura de 39°C, com concentração de 5,0%, de CO₂, por 22 a 24 horas.

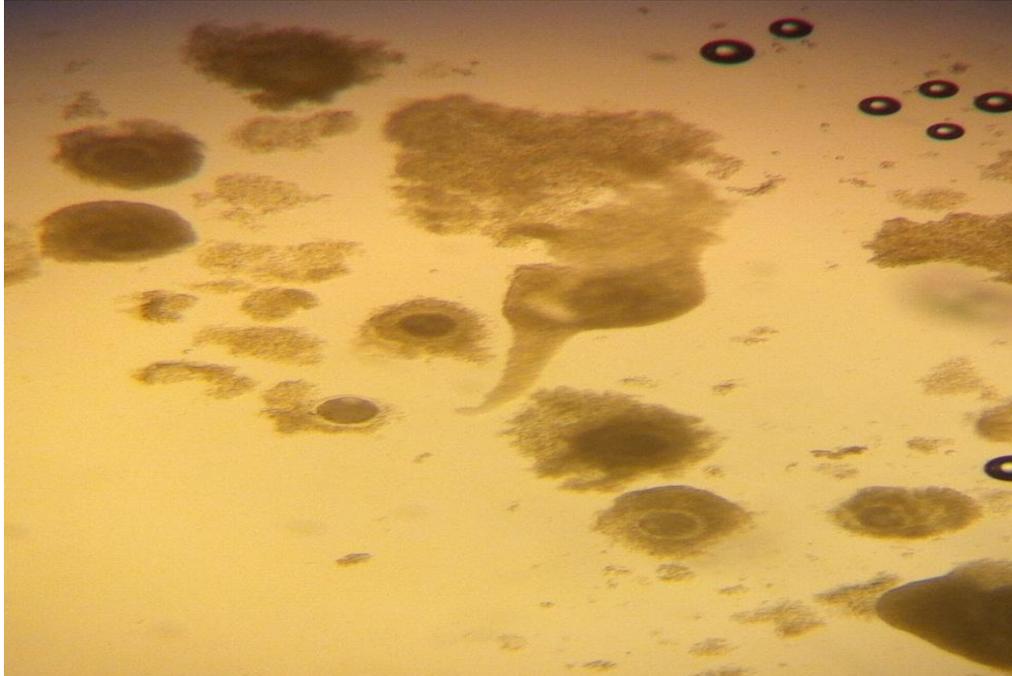


Figura 5: Ovócitos bovinos antes da maturação

Fonte: Diego B. Carneiro

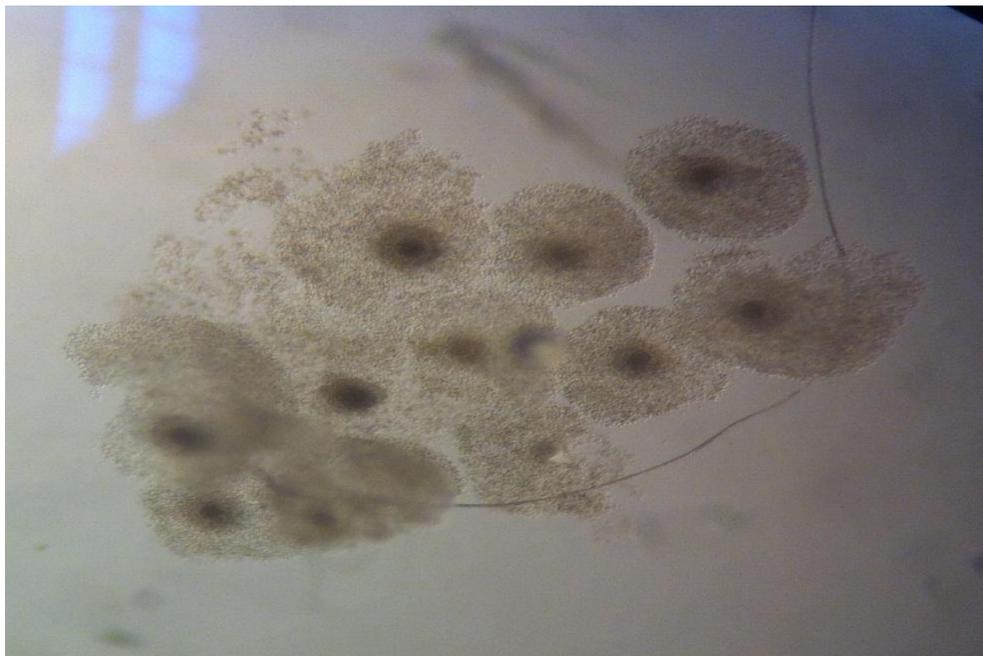


Figura 6: ovócitos bovinos após a maturação

Fonte: Diego B. Carneiro

3.3. Fertilização *in vitro*

Para realização desse procedimento, os meios são preparados 2 horas antes do horário programado para a fecundação. São preparados o meio de capacitação (CAP) final e o meio de fecundação (FEC) final (placa com gotas de 50 μ L), Percoll 45 e Percoll 90. Todos colocados na estufa para estabilização.

Após a escolha do sêmen, a palheta é descongelada em banho maria a 36°C por, pelo menos, 30 segundos. É secada e o exterior é desinfetado com álcool 70%, principalmente nas extremidades que serão cortadas. A extremidade é cortada e conteúdo recolhido para um tubo tipo Eppendorf e depositado sobre a placa aquecedora. Uma pequena quantidade de sêmen que sobrou na palheta é colocada em lâmina de vidro aquecida e levada ao microscópio invertido para fazer a avaliação de motilidade e vigor.

O sêmen do tubo é transferido delicadamente para a coluna de percoll (volume total: 1 ml), resultando em uma solução bifásica, e submetido a centrifugação em micro centrífuga a 6000 rpm por 2 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante é descartado e é adicionado 1ml de CAP final, para ressuspender o sedimento. É centrifugado novamente na mesma velocidade e tempo. Durante as centrifugações, os oócitos são retirados do meio de maturação e lavados em gotas individuais de FEC final, em seguida colocados nas suas respectivas gotas na placa de fecundação. Após a última centrifugação do sêmen, o sobrenadante é descartado e o sedimento é cuidadosamente ressuspendido com FEC final. O volume usado varia entre 50 e 100 μ L. Imediatamente 5 μ L desse sedimento é colocado em uma lâmina para avaliação de motilidade e vigor pós Percoll. Também são retirados 5 μ L e diluídos em 95 μ L de água ultra pura (cuja função é espermicida), para fazer a contagem dos espermatozoides na câmara de Neubauer.

3.4. Fecundação

A partir dos valores encontrados na contagem dos espermatozoides, obtém-se a dose inseminante, determinada pela equação:

- Concentração na câmara de Neubauer/volume da gota de fecundação = X
- X/motilidade pós Percoll = dose inseminante (μL)

Os ovócitos são retirados da estufa, adicionado o volume calculado de dose inseminante em cada gota de fecundação. As placas retornam para as estufas e permanecem por 18 horas, sendo este momento considerado o D0.

3.5. Cultivo *in vitro*

Passadas 18 horas da fecundação, as estruturas são retiradas do meio FEC final e lavadas em duas gotas de 100 μL de meio SOF final. As estruturas passam por esses banhos para retirar o excesso do meio anterior e remoção de CC e de espermatozoides mortos. Em seguida, as estruturas são colocadas em gotas com 100 μL de SOF final em placa de Petri (50X15) sob óleo mineral e retornam para a estufa.

No D2 as placas com os possíveis zigotos são avaliadas para determinar a taxa de clivagem. Nos dias 6,7 e 8 são observados respectivamente, os estágios de mórula e blastocisto e o rendimento embrionário final. Os embriões produzidos são envasados em palhetas de 0,25mL e destinados à transferência ou ao congelamento.

Todos os resultados são anotados em atas de controle de produção de embriões.

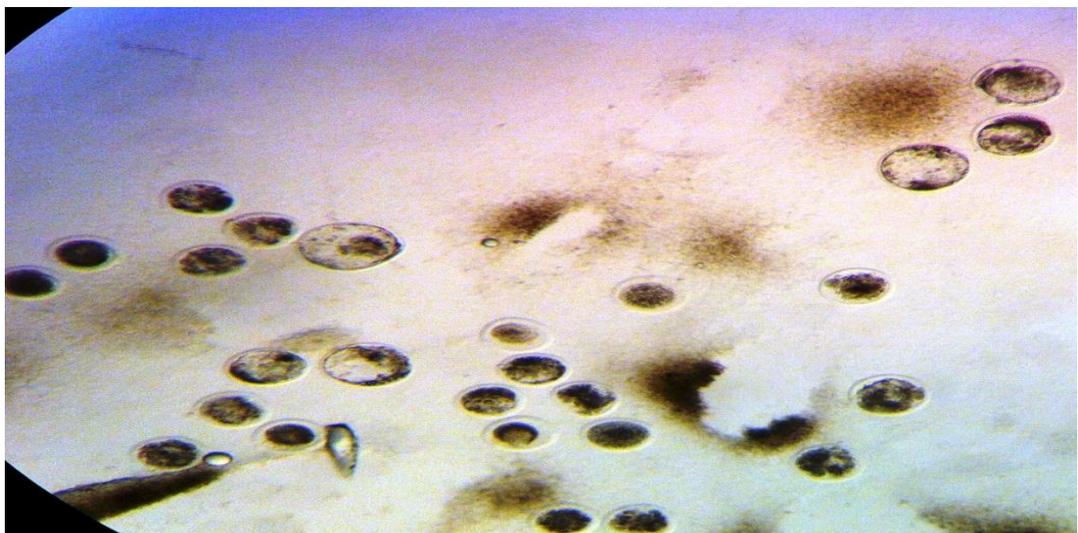


Figura 7: Embriões bovinos após 7 dias de desenvolvimento(D7)
Fonte: Diego B. Carneiro

3.6. Manipulação Hormonal

A manipulação hormonal é uma atividade frequente no CTZL, pois durante todo o ano são realizados experimentos que necessitam de vacas doadoras de material genético e receptoras. A sincronização do ciclo estral é adotada para facilitar o manejo reprodutivo dos animais e garantir uma maior eficiência dos trabalhos. O protocolo utilizado para as vacas receptoras e as destinadas a inseminação artificial (IA) é descrito a seguir.

Os animais recebem um tratamento á base de progesterona, benzoato de estradiol, eCG, prostaglandina e cipionato de estradiol para a indução da ovulação. No D0 as fêmeas recebem um dispositivo intravaginal contendo progesterona (Cronipres®), associado a uma injeção intra-muscular (IM) de 2 mg de benzoato de estradiol (Estrogin®). No D8 é retirado o dispositivo intra- vaginal e injetado IM 0,530mg de cloprostenol sódico (PGF2 α , Sincrocio®), 1mg de cipionato de estradiol (ECP®) e 400UI de eCG (Novormon®). Após a retirada do implante realiza-se a IA depois de 48 horas. Se os animais são destinados a transferência de embriões (TE), serão utilizados 7 dias após o momento do estro.

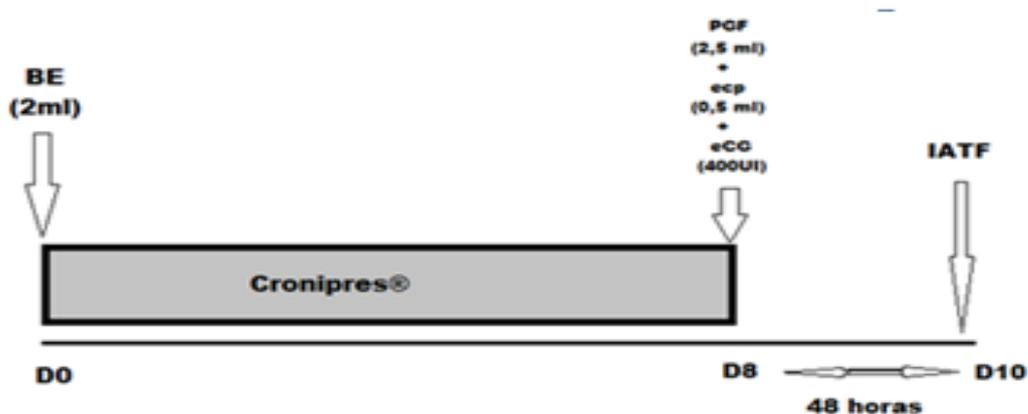


Figura 8: Protocolo de sincronização
Fonte: Diego B.Carneiro

Os animais que passavam por esse protocolo (60 animais) de manipulação hormonal eram preparados para realização da Inseminação Artificial, que ao todo foram 18 fêmeas ou eram utilizados como receptoras para as inovulações da FIV e clonagem. Foram realizadas 38 inovulações em fêmeas cruzadas.

Durante o estagio, acompanhei a 1ª etapa do experimento de mestrado do médico veterinário George Henrique. O experimento tem o objetivo de testar diferentes tratamentos para superovulação (SOV) com o objetivo de avaliar a quantidade e qualidade de ovócitos e a produção de embriões *in vitro* (PIVE).

Os animais utilizados para o experimento eram zebuínos da raça Sindi. Todos passaram por um exame ginecológico prévio, onde foram escolhidas as fêmeas cíclicas aptas. Foram selecionadas 14 fêmeas, essas foram divididas em 3 grupos: grupo 1- aplicação múltipla de FSH (n=5), grupo 2 aplicação única de FSH (n=5) e grupo controle sem utilização de hormônios (n=4).

No início do experimento (D0), todos os animais receberam um dispositivo intravaginal (Cronipres®) associado a aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (Estrogin®). Os animais do grupo 1 receberam 6 aplicações decrescentes de FSH (80mg), o grupo 2 recebeu uma única aplicação subcutânea de 80mg de FSH e o grupo controle não recebeu tratamento estimulatório. Os dispositivos intravaginais eram retirados no (D8), e imediatamente era realizada a aspiração folicular (AF) dos animais de cada grupo. Cada grupo passou por 5 sessões de aspiração, totalizando 70 sessões.

3.6. Aspiração folicular (AF)

A metodologia utilizada para obtenção de ovócitos foi a AF ou Ovum pick up, nomenclatura em inglês para designar a retirada de ovócitos de folículos de animais in vivo com auxílio de um ultrassom.

Os animais eram contidos em bretes, identificados e recebiam uma dose de 5 ml de Cloridato de Lidocaína (0,02g/ml) pela via epidural entre a última vertebra sacral e a 1ª coccígea. A vulva era higienizada com utilização de detergente neutro e água, secagem com papel toalha e posteriormente aspersão de álcool 70%.

Para a AF foi utilizado um equipamento de ultrassom Honda HS 1500V, acoplado a uma sonda convexa de 7,5 MHz, montada na guia de aspiração. O

sistema de aspiração conectado a guia, era composto por uma agulha 18G acoplada a uma mangueira que era ligada a um tubo coletor (tubo Falcon de 50 ml). A aspiração era realizada por uma bomba a vácuo de aspiração WTA-BVD11064, com pressão negativa de 45mm de mercúrio. O meio de aspiração era feito no dia anterior e deixado na estufa para e era composto por PBS acrescido de SFB, Gentamicina e heparina.

Após a verificação do bloqueio anestésico a guia era introduzida pela vagina e depois o braço pelo reto. O ovário era seguro e aproximado à guia para visualização no monitor do ultrassom e posterior aspiração dos folículos. Os ovócitos aspirados eram levados para o laboratório, sendo o tubo identificado com o nome do animal e o número de folículos aspirados. O material aspirado era despejado em filtro coletor de embriões para lavar o excesso de sangue, sendo utilizado PBS + SFB1%. Em seguida, material retido no filtro era despejado em uma placa de Petri (100x20) para o rastreamento dos ovócitos. Os demais procedimentos de MIV, FIV e CIV foram os descritos anteriormente.

As tabelas a seguir mostram os resultados parciais do experimento.

Tabela 2: Número de folículos aspirados, ovócitos recuperados e taxa de recuperação nos diferentes tratamentos.

	Nº de Foliculos	Nº de Ovocitos	Taxa de recuperação
Grupo Controle	163	122	74,84%
Grupo 1	257	237	92,21%
Grupo 2	221	190	85,97%

Tabela 3: Média de ovócitos recuperados por sessão e por vaca, rendimento médio de embriões por sessão e por vaca nos diferentes tratamentos.

	κ Ovo/vaca/ sessão	κº total de Embriõe	× Embriões/vaca/sessão
Grupo Controle	6,1	28	1.4
Grupo 1	9,48	42	1.68
Grupo 2	7,6	48	1.92

3.7. Clonagem

No período do estágio tive o privilégio de acompanhar o nascimento de um animal clone. O animal da raça Guzerá leiteiro nasceu no dia 23 de abril e recebeu o

nome de Brasília da Cerrados. A bezerra nasceu pesando 35 kg, saudável e de parto natural, fato raro de acontecer entre os clones. Normalmente, o parto é induzido, pois o clone não sinaliza a receptora quando vai nascer. A maioria dos clones enfrentam vários problemas durante a gestação e após o nascimento, como deficiências placentárias e anomalias. As principais anomalias são cardiopatias, placentação anormal, hidroalantoide, deficiência imunológica, disfunção renal, alterações no metabolismo energético hipertensão pulmonar e síndrome da cria gigante.

O animal é fruto da primeira experiência bem sucedida de clonagem a partir de células do tecido adiposo de bovino. A técnica de clonagem utilizada foi a transferência nuclear. Essa técnica basicamente consiste em transferir núcleos de células doadoras para o interior de ovócitos enucleados, resultando em indivíduos geneticamente idênticos ao animal doador do núcleo.

O sucesso da utilização dessa técnica clonagem pode contribuir para desenvolvimento de outras pesquisas, que estão ligadas a estudos de animais transgênicos, a produção de medicamentos que possam ser úteis para a saúde humana e preservação de espécies animais.



Figura 9: Bezerra clonado pela técnica de Transferência Nuclear (Brasília da cerrados)

Fonte: Diego B.Carneiro

4. Considerações Finais

As biotecnologias aplicadas à reprodução animal são ferramentas fundamentais para o progresso e fortalecimento da pecuária nacional. O desenvolvimento de novas técnicas pode ajudar a diminuir os custos de produção, maximizar e facilitar a transmissão do potencial genético dos animais superiores e tornar mais acessível as tecnologias de ponta para o produtor.

O Brasil já é destaque na produção e utilização dessas tecnologias, mas ainda é possível explorar bastante essa área. O criador precisa ter mais informações sobre a eficiência e os benefícios da utilização de algumas biotécnicas no sistema de produção.

O período de estagio supervisionado no CTZL foi muito importante, possibilitando um aprendizado prático na área de reprodução animal. Os trabalhos acompanhados e os resultados ajudaram aprofundar os conhecimentos no campo de atuação, e despertar um interesse ainda maior na área da reprodução animal.

5. Referências

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Perfil da agropecuária Brasileira - 2012. Disponível em: http://www.abiec.org.br/3_rebanho.asp#> acesso em: 06/07/2013.

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.

Armstrong, D.T.; Xia, P.; Gannes, DE D. et al. Differential effects of insulin-like growth factor-I and follicle stimulating hormone on proliferation and differentiation of bovine cumulus cells and granulosa cells. **Biol. of Reprod.**, v.54, p.331-338, 1996.

Assumpção, M.E.O.D.; Halpeck, 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 ionoforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Braz.J of Vet Res and Anim Sci**, Sao Paulo, v.39, n.2, p. 149-156, 2002.

Austin CR. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. **Aust J Sci Res**, v.4, p.581- 596, 1951.

Barros, C.M.; Ferreira, M.M.; Potiens, J.R.; Eberhardt, B.G.; Melo, D.S.; Monteiro, F.M. Influence of superstimulation and hormonal deprivation protocols on in vitro production of Nelore embryos (*Bos Taurus indicus*). **Reprod. Fert. and Dev**, 2006.

Bavister BD. Early history of in vitro fertilization. **Reprod.** v.124, p.181-196, 2002.

Beg, M.A.; Bergfelt, D.R.; Kot, K.; Ginther, O.J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular-fluid factors during development of follicle dominance. **Biol. of Reprod**, v.66, p.120–126, 2002.

Bergqvist A-S, Yokoo M, Bge R, Sato E, Rodriguez- Martinez H. 2005. Detection of the hyaluronan receptor CD44 in the bovine oviductal epithelium. **J Reprod. Dev.**, 51:445-453.

Bertolini, M.; Bertolini, L.R. Advances in reproductive technologies in cattle from artificial insemination to cloning.. **Rev. Med. Vet. Zoot.** v.56, p. 184-94, 2009.

Bó, G.A.; Baruselli, P.S.; Martínez, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **A. Reprod. Sci.**, v.78, p. 307–326, 2003.

Bó, G.A.; Moreno, D., Cutaia L., Baruselli P.S. Reis, E.L.. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. **Acta. Sci. Vet**, 32 (Supl): p.1-22. 2004.

Boland, M.P.; Crosby, T.F.; Gordon, I. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. **Theriogenology**, v.10, p.175, 1978.

Brackett RG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans Dressel MA. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biol Reprod**, v.27, p.147-158, 1982.

Brasil. Embrapa. Conhecimento, tecnologia e compromisso ambiental. Brasília, Embrapa Cerrados, 2º edição 2005.

Buratini JR. J.; Price, LA CA.; Visitin, J.A.; Bó, G.A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (bst) on ovarian follicular development in nelore (*Bos indicus*) heifers. **Therigenology**, v. 54, p. 421 – 431, 2000.

De Roover, R.; Feugang, J.M.N.; Bols, P.E.J.; Genicot, G. Hanzen, CH. Effects of Ovum Pick-up Frequency and FSH Stimulation: A Retrospective Study on Seven Years of Beef Cattle In Vitro Embryo Production. **Reprod. in Domes. Anim**, v.

43, p. 239–245, 2008.

Demoustier MM, Beckers JF, Van Der Zwalm P, Closset J, Gillard JL, Ectors F. 1988. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. **Theriogenology**, 30:379-386.

Diesel, O. T.; Efeito da estimulação ovariana 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, Fevereiro de 2010, 81p.

Dode, M. A. N. e Rumpf, R. Produção In Vitro de Embriões na Espécie Bovina: Uma Promissora Ferramenta de Multiplicação Animal. **Biol. Ciencia e Desenvol**, 2002, p. 32-27.

Elsden RP, Hasler JF, Seidel GE, Jr. 1976. Nonsurgical recovery of bovine eggs. **Theriogenology**, 6:523-532.

Filho, P.M.J.; Oliveira, A.F.; Torres, A. A.C. Produção embriões bovinos in e in vitro. . Universidade Federal de Viçosa, pró reitoria extensão e cultura/ Dep. Zoot. 21p-2012.

FORTUNE, J.E. et al. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biol of Reprod**, v.65, p.648-654, 2001.

Galli, C.; Duchi, R.; Crotti, G.; Turini, P.; Ponderato, N.; Colleoni, S.; Lagutina, I.; Lazarani, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology** v. 59, 2003, p. 599-616.

Gandhi AP, Lane M, Gardner DK, Krisher RL. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. **Human Reprod**, v.15, p.395-401, 2000..

Gearheart, W.W.; Smith, C.; Teepker, G. Multiple ovulation and embryo manipulation in the improvement of beef cattle: relative theoretical rates of genetic change. **J of Ani Sci**, v.67, p.2863-2871, 1989.

Ginther, O.J.; Bergfelt, D.R.; Beg, M.A. et al. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. **Biol of Reprod**, v.64, p.197-205, 2001.

Ginther, O.J.; Bergfelt, D.R.; Kulick, L.J.; Kot, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. **Biol. Reprod.**, v. 63, p. 383-389, 2000.

Gonçalves, P. B. D.; Figueiredo, J. R.; Freitas, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: Varela, v.1. 2002..15, p.395-401, 2000.

Gonçalves, P.B.D.; Barreta, M.H.; Sandri, L.R.; Ferreira, R.; Antoniazzi, A. Q. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.212-217, 2007.

Gordon I. Problems and prospects in cattle embryo transfer. **Ir Vet J**, v.39, p.39-62, 1975..

Hafez, **Biol. Reprod Anim**, 7.ed., Barueri, S.P.: Manole, p. 513, 2004.

Hafez, E.S.E.; **Reprod in farm anim**, 6ª edição, p. 573, 1995

Kane, M.T. A review of in vitro gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology, **Anim Reprod Sci**, v.79, p. 171–190, 2003.

Looney, C.R.; Pryor, J.H. Novel bovine embryo transfer technologies in the United States. **Anim Reprod**, v.9, n.3, p.404-413, 2012.

Lovie, M., García, A., Hackett, A., and Mapletoft, R. J. (1994). The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to Folltropin in

Holstein cows. **Theriogenology** 41, 241. [Abstract] doi:10.1016/S0093-691X(05)80151-7

Lucy, M.C.; Savio, J.D.; Badinga, L.; De La Sota, R.L.; Thatcher, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 70, p. 3615-26, 1992.

Martins C. M., Diferentes protocolos de superovulação com inseminação Artificial em tempo fixo em Bos taurus e Bos indicus, **Dissertação (mestrado)** Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2007.

Martins, M. G. R.R., Ávila, M.R. e De Conti, J.B. Recuperação de oócitos e produção in vitro de vacas estimuladas com FSH ou ECG. **Arch. Zootec.** 60 (232): 1021-1029. 2011.

Matton, P.; Adlakoun, V.; Couture, Y.; Dufour, J.J. Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrous cycle. **J. Anim. Sci.**, v.52, p. 813-20, 1981.

Mingoti GZ. Aspectos técnicos da produção in vitro de embriões bovinos. In: Tópicos Avançados em Biotecnologia da Reprodução, 2005, Jaboticabal, SP. Jaboticabal, SP: Funep, 2005. CD-ROM

Monteiro, F.M.; Ferreira, M.M.G.; Potiens, J.R.; Eberhardt, B.G.; Trinca, L.A.; Barros, C.M. Influence of Superovulatory Protocols on In Vitro Production of Nellore (Bos indicus) Embryos. **Reprod. Domestic. Anim** doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01399.x (in press) 2009..

Nascimento, B.A.; Seneda, M.M.; Silveira, C.; Pansard, H.; Associação de duas gonadotrofinas para superovulação de vacas doadoras de embriões. **Ciência Animal**, 14(2):89-94, 2004.

Nasser, L. F. T. Resposta superovulatória na primeira onda de crescimento folicular em doadoras Nelore (*Bos taurus indicus*). 2006, 80f. Tese (Doutorado) - USP . FMVZ. **Depart Reprod anim**. São Paulo.

Neves, P.J.; Miranda, K. I. .; Tortorella, D. L. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Rev. Bras. Zootec**, v.39, p.414-421, 2010.

Papaioannou, VE, Ebert KM. Developmental of fertilized embryos transferred to oviducts of immature mice. **J Reprod Fertil**, v.76, p.603-608, 1986.

Pfeifer, L. F. M.; Corrêa, M. N.; Pineschi, L. E. Universidade Federal de Pelotas: Alternativas hormonais para programas de transferência de embriões em bovinos, Faculdade de Veterinária, 2005.

Pincus G, Enzmann E. The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro. **J Exp Med**, v.62, p.665-675, 1935.

Prado, F. R. A.; Toniollo G. H.; Oliveira, J. A. Superestimulação ovariana em vacas da raça Gir leiteiro com uso de diferentes concentrações de FSH. **Arq. Vet**, Jaboticabal, SP, Vol. 23, nº3, 172-177, 2007.

Ramos, A.A.; Ferreira, A.M.; Sá W.F.; Camargo, L.S.A.; Viana, J.H.M.; Henry, M.R.J.M. Protocolos de produção in vitro de embriões na raça Gir. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.58, n.3, p.341-347, 2006.

Rasi, F. P. A. Técnicas de superovulação, colheita e transferência de embriões em bovinos. 2005. 27f. **Dissertação (mestrado)**- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu..

Rhodes, F.M.; Fitzpatrick, L.A.; Entwistle, K.W.; Death, G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anestrus. **J Reprod and Fertil**, Cambridge, v.104, p.41-49,1995.

Roover, R.; Genicot, G.; Leonard, S.; Bols, P.; Dessy, F.; Ovum pick up and in vitro embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. **Anim Reprod Sci**, 86, 13–25, 2005.

Rowson, L.E.A.; Lawson, R.A.S.; Moor, R.M.; Baker, A.A. Egg transfer in the cow: synchronization requirements. **J Reprod Fertil**, v.28, p.427-431, 1972.

Ryan, D. P.; Snildears, S.; Aarts, A.; O'farrel, K. J.; Effect of estradiol subsequent to induced luteolysis on development of the ovulatory follicle and interval to estrus and ovulation. **Theriogenology**, New York, USA, v. 43, p.310 , 1995.

Sá Filho, M. F. ; Reis, E.L. ; Ayres, H.; Gimenes, L.U.; Peres, A.A.P.; Carvalho, C.A.B. ; Carvalho, J.B.; Araujo, C.A.S.C.; Baruselli, P.S. Effect of oestradiol valerate or benzoate on induction of a new follicular wave emergence in *Bos indicus* cows and heifers treated with norgestomet auricular implant. **Reprod. Fertil. Devel**, v. 18, p. 289, 2006.

Sávio, J. D.; Keenan, L.; Boland, M, P. and Roche, J. F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers. **J. Reprod. Fert.**, v.83, p. 663-671, 1988.

SILVA, A.E.D.F.; Reação acrossômica induzida: método indicador de fertilidade de touros. Brasília: Embrapa, Recursos Genéticos e Biotecnologia, Série Documentos, nº35, 37p. 1998.

Sirois, J.; Fortune, J.E. Lengthening of the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. **Endocrinology**, v. 127, p. 916-25, 1990.

Smith LC, Meirelles FV, Bustin M, Clarke HJ. Assembly of somatic histone H1 onto chromatin during bovine early embryogenesis. **J Exp Zool**, v.273, p.317-326, 1995.

Spicer, L.J.; Stewart, R.E. Interactions among basic fibroblastic growth factor, epidermal growth factor, insulin, and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors. **Biol. Reprod**, v.54, p.255-263, 1996.

Stroub, B. IETS 2011 Statistics and Data Retrieval Committee Report: The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. Disponível em: <<http://www.iets.org/pdf/December2012.pdf>>. Acesso em: 06/07/2013.

Sutherland, W. (1991). Novel material from biological sources. In "Biomaterials". (Ed. D. Byrom). pp. 307–333. (Stockton Press: New York.) **Theriogenology**, v. 48, p. 75-87, 1997.

TECNOPEC, 2008. Manual técnico sobre Sincronização e inseminação Artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos 2008. Disponível em: <http://www.tecnopec.com.br/filearchive/a167eba757262f3b722a9b7c9f8fbfb9.pdf>. Acesso: 06/07/2013.

Valle, E.; R. Ciclo estral dos bovinos e métodos de controle. Embrapa CNPGC, Mato Grosso do Sul, documentos 48, 1991.

Varago, C.F.; Mendonça, F.L; Lagares, A.M. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.100-109, 2008.

Whitten WK, Biggers JD. Complete development in vitro of pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. **J Reprod Fertil**, v.17, p.399-401, 1968.

WOOLUMS, A.R.; PETER, A.T. Cystic ovarian condition in cattle: Part I. Folliculogenesis and ovulation. **Compend. Cont. Educ. Article**, v. 16, p. 935-43, 1994.