



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**TRANSFERÊNCIA INTRAFOLICULAR DE OVÓCITOS IMATUROS
(TIFOI): REVISÃO DE LITERATURA**

Andressa Jalyne de Sousa Barbosa

Orientador: Prof. Dr. Ivo Pivato

BRASÍLIA - DF

JULHO / 2018



ANDRESSA JALYNE DE SOUSA BARBOSA

**TRANSFERÊNCIA INTRAFOLICULAR DE OVÓCITOS IMATUROS
(TIFOI): REVISÃO DE LITERATURA**

Trabalho de conclusão de curso de
graduação em Medicina Veterinária
apresentado junto à Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Ivo Pivato

BRASÍLIA – DF

JULHO / 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Jt Jalyne de Sousa Barbosa, Andressa
Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos
(TIFOI): revisão de literatura / Andressa Jalyne de Sousa
Barbosa; orientador Ivo Pivato. -- Brasília, 2018.
32 p.

Monografia (Graduação - Medicina Veterinária) --
Universidade de Brasília, 2018.

1. TIFOI. 2. Produção in vitro de embriões. 3.
Transferência de embriões. I. Pivato, Ivo, orient. II.
Título.

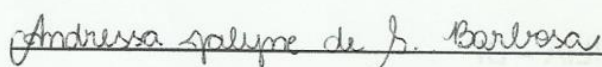
CESSÃO DE DIREITOS

Autor: Andressa Jalyne de Sousa Barbosa

Título: Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI): revisão de literatura

Ano: 2018

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia 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 desta monografia pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.



Andressa Jalyne de Sousa Barbosa

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: BARBOSA, Andressa Jalyne de Sousa

Título: Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI): revisão de literatura

Trabalho de conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Aprovado em 02/07/2017

Banca examinadora

Prof. Dr. Ivo Pivato

Julgamento: APROVADA


Instituição: UnB

Assinatura: 

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira

Julgamento: Aprovada

Instituição: UnB

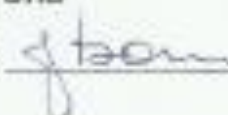
Assinatura: 

Profa. Dra. Juliana Targino Silva

Almeida e Macedo

Julgamento: Aprovada

Instituição: UnB

Assinatura: 

DEDICATÓRIA

À minha mãe, por tamanha dedicação e amor, por ser meu alicerce em todos os momentos e por ter abdicado de seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo conforto espiritual nos momentos mais difíceis e por toda a graça alcançada. É no exercício da fé que encontro forças para seguir em frente.

À Universidade de Brasília e à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária pela oportunidade.

Aos professores que contribuíram para a minha formação e que desempenham com amor suas atividades. Em especial, agradeço ao professor Rodrigo Arruda, por ser um exímio profissional e transparecer tanto orgulho pela Medicina Veterinária e à professora Luci Sayori Murata, por me orientar no âmbito da pesquisa durante a graduação.

Ao meu amado orientador Ivo Pivato, por despertar em mim a paixão pela Reprodução Animal e me fazer acreditar que eu seria capaz. Seu carisma e profissionalismo são admirados por todos que o conhecem.

Aos meus pais, Anacir Pereira e Jaime Vieira, por acreditarem no meu sonho e me fornecerem todo suporte sempre.

Ao meu irmão Marcus, pelos momentos de descontração. Você é meu anjo da guarda.

Ao meu avô Joaquim (*in memoriam*), que em seu íntimo já sabia o caminho que eu trilharia.

À família que a Universidade me permitiu escolher: Adara Diamante, Mariana Bonow, Karina Araújo, Rebeca Lessa, Amanda Cabral, Giulianna Obeid, Gabriela Galiza, Cecília Granato, Gabriela Rezende, Marina Reis, Savana Alves, Amanda Oliveira e Bryam Amorim. Obrigada por compartilharem comigo este sonho, com tantos momentos de alegria.

Aos meus amigos que sempre se orgulharam de mim e me deram forças quando tudo parecia perdido: Gabriela Brito, Amanda Queiroz, Adriana Queiroz e Patrick Fraga. Vocês são presentes de Deus em minha vida.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela oportunidade de conhecer o trabalho desenvolvido através do estágio supervisionado.

Aos pesquisadores, funcionários, pós-graduandos e estagiários pela paciência e disponibilidade em compartilhar o conhecimento. Em especial, agradeço à Taynan Kawamoto e à Luana Celin pela amizade construída ao longo desses quatro meses.

Enfim, a todos que estiveram ao meu lado durante essa jornada, muito obrigada.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO	11
2. PRODUÇÃO <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	12
2.1. Superovulação e transferência de embriões (TE)	12
2.2. Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE)	13
3. TRANSFERÊNCIA INTRAFOLICULAR DE OVÓCITOS IMATUROS (TIFOI).....	14
3.1. Histórico.....	15
3.2. Princípios da TIFOI.....	16
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
5. RELATÓRIO DE ESTÁGIO.....	26
5.1. Local.....	26
5.2. Atividades desenvolvidas	26
5.3. Conclusão.....	29

RESUMO

A transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) é uma biotécnica reprodutiva desenvolvida recentemente e, no Brasil foi implementada e modificada pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Considerando que o país lidera a produção mundial de embriões, é de extremo interesse comercial que os produtores tenham uma terceira opção para a produção de embriões que associe as vantagens encontradas nas demais tecnologias já estabelecidas: a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE). A principal vantagem dessa técnica é a possibilidade de realizar todos os passos necessários para a produção de um embrião dentro da fazenda, onde a própria fisiologia das fêmeas é responsável pelo desenvolvimento embrionário. Para a execução da técnica, os ovócitos imaturos da fêmea doadora são obtidos através da aspiração folicular e injetados no folículo dominante de uma fêmea ovuladora. Dentro deste folículo, ocorrerá a maturação destes ovócitos e a consequente ovulação. A fecundação e desenvolvimento embrionário inicial ocorrerá no próprio trato reprodutivo desta fêmea. Sete dias após a injeção, os embriões são recuperados através da lavagem uterina e podem ser transferidos para as fêmeas receptoras, que levarão a gestação a termo ou podem ser criopreservados para posterior transferência.

Palavras-chave: criopreservação, injeção folicular, *in vitro*, *in vivo*, TIFOI

ABSTRACT

Whereas that Brazil is the lead of cattle embryo production it is importante the breeders have another option for embryo production. IFIOT mixes the advantages of other assisted reproductive technologies (ART) have already established: embryo transfer (ET) and *in vitro* embryo production (IVEP). The main advantage of this ART is the possibility of carrying out all embryo production steps without a basic laboratory the immature oocytes are obtained by ovum pick-up and injected into the dominant follicle of recipients. This recipients are inseminated and embryonic development will occur in their uterus. Subsequently the possible embryos will be recovered by uterine flushing 8 days after IFIOT. The recovered embryos are immediately transferred to previously synchronized recipientes or frozen.

Keywords: cryopreservation, follicular injection, *in vitro*, *in vivo*, IFIOT

1. INTRODUÇÃO

O Brasil, por ser um país tipicamente agrário, é referência na área de reprodução animal devido ao desenvolvimento de pesquisas e uso comercial de diversas tecnologias, tais como: inseminação artificial, transferência de embriões e produção *in vitro* de embriões (PIVE).

Nos últimos 15 anos, o método de produção de embriões restringiu-se quase completamente à produção *in vitro* (PIVE), reduzindo consideravelmente a prática convencional de embriões *in vivo*. Desde 2010, são produzidos mais de 300.000 embriões ao ano através da PIVE (VIANA, 2017).

No contexto mundial, o Brasil é o maior produtor mundial de embriões obtidos *in vitro*, porém está colocado em 11^o lugar na disseminação das tecnologias associadas ao embrião, ou seja, mesmo com um crescimento de cerca de 726,5% nos últimos 20 anos, a tecnologia de embriões ainda está restrita a 0,33% do rebanho em idade reprodutiva (VIANA, 2017). Por isso, o país tem potencial para adoção e disseminação de novas tecnologias para a produção de carne e leite, através de cruzamentos que visam o melhoramento genético e, assim, melhoram as atividades comerciais (VIANA, 2017), já que a produção pecuária tem grande importância econômica no país e o rebanho já ultrapassa 218 milhões de cabeças (IBGE, 2016).

Dentre as possibilidades para a produção de embriões, estão bem estabelecidas as técnicas de superestimulação ovariana (SOV) das doadoras e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) associada à aspiração folicular por ultrassonografia.

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de apresentar a biotécnica Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI), recém-desenvolvida pela Embrapa, que associa as vantagens da produção *in vivo* e *in vitro* de embriões para acelerar a produção de embriões produzidos por animais geneticamente superiores associada à redução de custos e as perspectivas comerciais da técnica.

2. PRODUÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DE EMBRIÕES

2.1. Superovulação (SOV) e transferência de embriões (TE)

A biotécnica já estabelecida para produção *in vivo* de embriões consiste na superovulação (SOV) ou indução da ovulação múltipla da fêmea doadora através da administração de hormônios para induzir a maturação de vários folículos para posterior transferência (TE). Após a detecção do estro ou indução da ovulação, a fêmea é exposta a monta natural ou inseminada artificialmente. No D6, D7 ou D8, ela é submetida ao processo de coleta de embriões por meio da lavagem uterina. Os embriões recuperados, que geralmente apresentam boa qualidade, são transferidos para as fêmeas receptoras, responsáveis pelo desenvolvimento deles até o momento do parto. Assim, segundo MICHAEL et al. (2017), 90% dos ovócitos ovulados são fertilizados após a inseminação e se desenvolvem até o estágio de blastocisto.

O protocolo hormonal deve ser feito antes do estabelecimento da dominância folicular para que se tenha a estimulação do maior número de folículos em uma mesma onda, ou seja, para manter a concentração de FSH necessária para ocorrer o desenvolvimento simultâneo deles. Para a superestimulação hormonal, pode ser necessário ou não a detecção do estro natural da doadora.

Caso seja observado o estro, administra-se a gonadotrofina durante o diestro, ou seja, entre o 9^o e o 14^o dia do ciclo estral. Esse estro também pode ser induzido através da aplicação de substâncias luteolíticas (REICHENBACH et al., 2008).

A gonadotrofina mais comumente utilizada é o hormônio folículo-estimulante (FSH), que é aplicado durante quatro dias, sendo duas injeções diárias em doses decrescentes. A aplicação de prostaglandina (PGF2 α) pode ser feita no penúltimo dia de tratamento com FSH, desencadeando o cio após 36 a 40 horas. A inseminação artificial (IA) é feita 12 horas após a observação do cio e repetida 12 horas após a realização da primeira (FERREIRA, 2010).

Para o tratamento hormonal sem a interferência da detecção do cio, utiliza-se um dispositivo intravaginal ou um implante auricular impregnado com progestágenos. Para a introdução do dispositivo intravaginal, é preferível que o animal esteja na fase de diestro, pois a cérvix estará fechada, evitando a ocorrência de infecções uterinas (REICHENBACH et al., 2008).

Independente do protocolo escolhido, o corpo lúteo deverá sofrer regressão ao final do tratamento, para descartar a possibilidade de algum embrião se desenvolver. A luteólise será promovida pela aplicação de prostaglandina (PGF2 α) sintética (REICHENBACH et al., 2008).

A SOV pode ser feita a cada 35 a 60 dias, porém sabe-se que o número de embriões recuperados diminui ao longo do tempo, visto que a utilização do hormônio folículo estimulante (FSH) altera os padrões da dinâmica folicular. As taxas de recuperação estão ligadas ao protocolo utilizado, às características reprodutivas intrínsecas ao animal doador e ao intervalo dado entre superestimulações hormonais.

2.2. Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) baseia-se na manipulação dos gametas em laboratório e a obtenção de embriões fora do trato reprodutivo da fêmea. Nessa biotécnica, os ovócitos imaturos podem ser recuperados por meio da aspiração transvaginal de ovócitos, guiada por ultrassom ou pela aspiração de ovários vindos de abatedouro. Esses ovócitos serão maturados, fecundados e, posteriormente, os embriões são cultivados durante sete dias, para alcançarem o estágio desejado para a transferência.

Na PIVE, a obtenção dos ovócitos por meio da OPU pode ser semanal. Em contrapartida, para que se tenham bons resultados nas manipulações, é necessário o investimento inicial em infraestrutura laboratorial e profissionais capacitados para o desenvolvimento da técnica, desde a aspiração folicular até o desenvolvimento *in vitro* dos embriões.

Mesmo sendo uma tecnologia de grande potencial, a PIVE apresenta uma série de fatores limitantes, tais como: menor viabilidade, já que apenas 30 a 40% do ovócitos submetidos a maturação e fertilização evoluem até a fase de

blastocisto e, conseqüentemente geram menores taxas de prenhez quando comparados aos produzidos *in vivo*. Além disso, estudos anteriores feitos por FARIN et al. (1995), afirmam que há diferenças relacionadas a criotolerância, ultraestrutura, microvilosidades, teor lipídico e perfil de expressão gênica dos embriões produzidos *in vitro* comparados aos *in vivo*.

A produção *in vitro* é hipoteticamente responsável pelas baixas taxas de desenvolvimento embrionário, já que a manipulação laboratorial provoca mudanças bioquímicas e morfológicas, permite maior acúmulo de lipídios, variações no consumo de O₂ e na expressão gênica. Aliás, algumas moléculas específicas produzidas no trato reprodutivo das fêmeas se mostraram essenciais ao bom desenvolvimento do embrião (SPRICIGO et al., 2016)

Através de um experimento de acesso ao oviduto das fêmeas via endoscópio para recuperação dos embriões ainda no estágio tubário, BESENFELDER et al. (2001) concluiu que a competência para o desenvolvimento até o estágio de blastocisto é determinado na fase de 2 células e a qualidade desse blastocisto, por sua vez, depende do ambiente pós fecundação.

3. TRANSFERÊNCIA INTRAFOLICULAR DE OVÓCITOS IMATUROS (TIFOI)

Esta biotécnica, aprimorada no Brasil pelo grupo de pesquisadores da “Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia”, consiste em uma terceira opção para a multiplicação rápida de germoplasma feminino no país (SPRICIGO et al., 2016).

Nessa técnica, são necessárias três categorias animais: as fêmeas doadoras de ovócitos, as ovuladoras e as receptoras de embrião. Por meio da OPU, os ovócitos imaturos são retirados dos folículos das doadoras e injetados no folículo dominante, maior que 10mm, da vaca ovuladora que foi submetida a um protocolo de sincronização para que estivesse próximo ao estro no momento da injeção. Esta fêmea é inseminada artificialmente e, a partir desse momento, será responsável por todos os processos fisiológicos que ocorrem para o desenvolvimento embrionário inicial até o estágio de blastocisto. No oitavo dia após a injeção dos ovócitos, os embriões são recuperados através da lavagem

uterina e podem ser transferidos para as fêmeas receptoras, que poderão levar a gestação a termo ou podem ser criopreservados através do congelamento clássico ou vitrificação.

Dentre as vantagens da técnica estão: a simplicidade do sistema, o que sugere melhor acessibilidade para os produtores e menores custos, já que são dispensáveis: a superestimulação hormonal, a estrutura laboratorial, os meios, os equipamentos de cultivo e o transporte de ovócitos e de embriões, pois todo o desenvolvimento embrionário ocorre dentro dos animais presentes na fazenda. A exemplo disso, a produção por meio dessa técnica pode ser duas a três vezes mais acessível que a SOV ou a PIVE. Sendo assim, ela é viável para grandes e pequenos produtores, favorecendo o ganho genético de todos eles. Ademais, os embriões advindos dessa técnica tendem a ser de melhor qualidade, visto que toda a produção ocorre no trato reprodutivo das fêmeas.

3.1. Histórico

A técnica de transferência de ovócitos imaturos para o interior de um folículo pré-ovulatório foi introduzida por FLEMING et al. (1985). Nesse experimento, as fêmeas doadoras foram superestimuladas com FSH durante 4 dias, submetidas à castração (OSH) para a obtenção dos ovários e posterior aspiração folicular. Os ovócitos imaturos recuperados foram transferidos para os ovários das fêmeas ovuladoras que continham um folículo dominante, através de uma incisão no flanco.

Em 1991, HINRICHS & DIGIORGIO adaptaram a técnica para a utilização em éguas. Através da inserção de um trocater e uma cânula no flanco, alcançaram o ovário para perfurar o folículo. Em 1997, GOUDET et al. executaram a técnica através da guia transvaginal.

O primeiro relato de embriões produzidos por meio da injeção de ovócitos e inseminação artificial subsequente foi em 1998, por BERGFELT et al., porém os embriões foram recuperados na fase inicial de desenvolvimento após o abate dos animais, ou seja, não houve registro de nascimentos.

Em 2015, o primeiro registro de nascimentos através da técnica foi feito por um grupo de pesquisadores alemães (KASSENS et al., 2015). Nesse estudo, foram utilizados ovários obtidos de abatedouro para a recuperação dos ovócitos. Folículos de 3 a 8mm foram aspirados e maturados *in vitro* durante 16 a 22 horas, período entre a injeção de GnRH e a transferência dos ovócitos maturados para o folículo pré-ovulatório da fêmea ovuladora.

Nesse contexto, foi em 2016, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Fazenda Sucupira), a primeira vez que a técnica foi desenvolvida completamente *in vivo*, utilizando ovócitos imaturos e resultando em embriões e gestações que vieram a termo (SPRICIGO et al., 2016)

3.2. Princípios da TIFOI

Sincronização da ovuladora

O animal selecionado será submetido ao protocolo para sincronização de estro, que consiste na introdução de um dispositivo intravaginal de progesterona associado à aplicação intramuscular de 2mg de benzoato de estradiol. Após oito dias, aplica-se 2ml de PGF2 α (0,150mg d-cloprostenol) via intramuscular e é realizada a retirada do implante. No dia seguinte, aplica-se 1mg de benzoato de estradiol via intramuscular (SPRICIGO, 2016).

Para que aconteça a TIFOI, todas as receptoras são avaliadas com o intuito de selecionar os animais que responderam bem ao protocolo, isto é, que apresentem um único folículo pré-ovulatório ≥ 10 mm com boa vascularização (SPRICIGO, 2016). Os graus de vascularização variam de 1 a 5, sendo 1) ausente (0 – 20 %); 2) inicial (20-40%); 3) intermediária (41-60%); 4) intensa (61-80%); 5) completa (81-100%).

Aspiração folicular (OPU: ovum pick up) das doadoras para obtenção dos ovócitos imaturos

Primeiramente, o animal que será submetido ao procedimento de aspiração folicular é contido em um tronco, onde realiza-se a antisepsia local e, após, anestesia epidural. A área é higienizada e seca para receber a guia de aspiração. É importante abrir bem a vulva para introduzir a guia até o fórnix vaginal, direcionando a agulha para o ovário a ser aspirado. A guia utilizada apresenta uma probe setorial micro convexa com 7.5 MHz. Os folículos entre 3 e 8mm são aspirados.

A aspiração *in vivo* (OPU) permite a recuperação de ovócitos por meio da punção folicular, utilizando uma agulha 18 a 19G acoplada à sonda transvaginal. Acoplado a esse sistema, está a bomba a vácuo que permite a recuperação dos complexos cúmulo-ovócitos (COCs) e do líquido folicular para o tubo coletor.

É de suma importância a verificação da pressão da bomba a vácuo para evitar que os COCs sofram modificações e prejudique a quantidade de ovócitos recuperados e a qualidade deles. A pressão ideal de aspiração é correspondente 10 a 15mL de líquido por minuto.

As características morfológicas dos ovócitos recuperados estão relacionadas com as taxas de desenvolvimento até a fase de blastocisto. Por isso, visualmente, avalia-se a aparência do citoplasma, sua coloração e nível de homogeneidade, e o número de camadas de células do cumulus presente com o nível de compactação delas.

Injeção dos ovócitos no folículo dominante da ovuladora

Considerado o D0, a injeção dos ovócitos imaturos ocorrerá 52 a 58 horas após a remoção do implante de progesterona, ou seja, 4 a 6 horas após o início do estro.

Para obter êxito no desenvolvimento desse processo, é essencial que o animal esteja bem contido e submetido à anestesia epidural com Lidocaína 2% para relaxar a musculatura da parede retal e evitar o esforço abdominal contra a introdução da guia.

Para o procedimento, é necessária uma guia transvaginal com uma probe de 7,5MHz e um mandril, onde será acoplada, em uma extremidade, uma

seringa de insulina, e uma agulha 27G na outra extremidade. Todo o sistema é preenchido com PBS aquecido e, no final, puxar uma coluna de ar de aproximadamente 1cm para dentro do sistema.

Os ovócitos mantidos no líquido folicular são carregados por pressão negativa na agulha. O sistema é colocado na guia e posicionado no fórnix vaginal em direção ao ovário que contém o folículo dominante, maior que 10mm, que será manipulado através da palpação retal.

A agulha é conduzida através da parede vaginal e estroma ovariano. Quando a agulha estiver visível no antro folicular, visto como uma estrutura redonda e não ecogênica na imagem ultrassonográfica, um assistente deve injetar de forma constante o fluido folicular que contém os ovócitos. É imprescindível o cuidado no momento da introdução da agulha para não haver extravasamento de líquido folicular. O momento da injeção é acompanhado pelo ultrassom, já que os ovócitos são estruturas ecogênicas, vistas em movimento dentro do folículo.

Após a injeção, o sistema deve ser retirado e lavado com 1ml de PBS para certificar, na lupa, se todos os ovócitos foram injetados e não há nenhuma estrutura retida na agulha.

Ao final deste processo, administrar 1ml de GnRH (Gestran) pela via intramuscular.

Inseminação artificial (IA) na ovuladora

A inseminação artificial ocorre logo após a injeção dos ovócitos na fêmea ovuladora. Para isso, a palheta de sêmen é retirada do botijão com nitrogênio líquido e descongelada em banho maria por 30 segundos. Após, a palheta de sêmen é montada no aplicador para transpor os anéis da cérvix e, assim, o sêmen é depositado no corpo do útero. Estudos estão sendo desenvolvidos para avaliar a necessidade de uma segunda inseminação para melhores resultados.

Lavagem uterina na ovuladora para coleta de embriões

Oito dias após a TIFOI, o útero das ovuladoras é submetido à lavagem. A avaliação ultrassonográfica deve ser feita previamente para verificar a presença do corpo lúteo, o que indica que houve ovulação. Nesse momento, é desejável que os embriões estejam em estágio de blastocisto (D7).

A fêmea ovuladora deve ser bem contida em um tronco e submetida a uma anestesia peridural com lidocaína 2%. A cauda do animal deve ser presa e a região perineal bem higienizada antes de dar início ao procedimento.

Deve-se selecionar um expansor cervical esterilizado para ultrapassar a cérvix e em seguida uma sonda de Foley com mandril é introduzida. Após atravessar a cérvix, o balão é inflado com cerca de 3ml de PBS para impedir o extravasamento de líquido pelo orifício da cérvix. Nesse momento, a sonda pode ser direcionada para um dos cornos ou fixada no corpo do útero. Um litro de PBS aquecido a 25-37°C, pH 7,2 e osmolaridade de 290 miliosmol é inserido no útero por gravidade, em alíquotas compatíveis com o tamanho dele, ou seja, em volumes de 50 a 160ml e, após, drenado para um filtro com uma membrana que retém as estruturas e permite desprezar o PBS excedente ao necessário para manter os embriões em suspensão até a avaliação no estereomicroscópio (lupa). É importante manipular bem os cornos uterinos para drenar todo o líquido introduzido.

As estruturas recuperadas são colocadas em uma placa de Petri contendo solução tampão de fosfato para manter os embriões viáveis. Esta solução é suplementada com soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA), além de antibióticos.

Os embriões são divididos em grupos de no máximo dez e lavados novamente, com a passagem de gota para gota de meio de manutenção. Durante esse processo, faz-se a classificação de acordo com a fase de desenvolvimento e a qualidade, que compreende a avaliação da integridade da zona pelúcida e aspecto morfológico.

Transferência (TE) ou criopreservação dos embriões

Transferência de embriões (TE)

A transferência de embriões (TE) pode ser feita após a classificação dos embriões recuperados. As fêmeas receptoras estarão sincronizadas em D6, D7 ou D8, sendo que as vacas sincronizadas que não foram utilizadas como ovuladoras também podem receber um embrião. O protocolo consiste em avaliar esses animais previamente quanto à presença de um corpo lúteo (CL) e suas características.

Após a avaliação, as fêmeas são contidas em tronco, realiza-se a antissepsia e a anestesia epidural baixa com cerca de 3ml de lidocaína 2%. Os embriões são armazenados em palhetas de 0,25ml com meio Holding, colocadas em um inovulador que será inserido via intravaginal. Este será guiado para o terço final do corno uterino ipsilateral ao CL, onde será depositado o embrião.

Criopreservação dos embriões

A criopreservação de embriões é uma tecnologia desenvolvida para preservar o metabolismo celular em estado de quiescência, para continuar o desenvolvimento após período de estocagem indeterminado. Com a redução da temperatura, o embrião para a atividade enzimática, o metabolismo e a respiração celular (GORDON, 1994). Para a realização da técnica, é necessário o uso de solutos orgânicos, os crioprotetores, que são responsáveis por substituir a água intracelular e estabilizar as membranas dessas células.

O primeiro relato da técnica foi feito por WHITTINGHAN (1971), referente à conservação de embriões de camundongo. Em bovinos, WHILMUT & ROWSON (1973), desenvolveram a técnica para conservação de embriões bovinos excedentes da produção via TE ou PIVE.

Dentre os benefícios de sua utilização estão: o uso de receptoras em cio natural, aproveitamento de receptoras que não receberam embrião no dia da coleta, realização de transferência de embriões em fêmeas pertencentes a rebanhos de cruzamento industrial, controle do nascimento de bezerros de acordo com o manejo da propriedade, formação de bancos de germoplasma para espécies em extinção, facilidade para a aquisição e venda de embriões de alto valor genético no comércio internacional, reduzindo custos e eliminando o período

de quarentena e os riscos de transporte, além de assegurar o aspecto higiênico sanitário do rebanho (PYLES, 2003).

O princípio fundamental da técnica consiste na remoção máxima de água intracelular antes da criopreservação para evitar a formação de cristais de gelo (VAJTA & KUWAYAMA, 2006). O sucesso da criopreservação e a susceptibilidade do embrião a crio injúrias estão relacionados à espécie, ao estágio de desenvolvimento embrionário, ao tipo e a concentração de crioprotetores utilizados, à origem dos embriões produzidos, ao tempo de exposição às soluções crioprotetoras e de reidratação, à velocidade de resfriamento e aquecimento, ao método de envase, remoção do crioprotetor e cultivo pós-criopreservação.

Congelamento clássico

O congelamento lento ou clássico, desenvolvido por WHITTINGHAM (1973) é o método mais comumente utilizado para embriões. Para o desenvolvimento dessa técnica, é necessária uma máquina programável para o controle da redução gradual da temperatura da curva de resfriamento que antecede a imersão dos embriões no nitrogênio líquido. Durante o processo, ocorrem trocas entre os meios intra e extracelular para evitar a formação de cristais de gelo, danos tóxicos e osmóticos às células.

A congelação lenta ou clássica consiste no pré-equilíbrio dos embriões em solução crioprotetora para serem submetidos à redução gradual da temperatura em uma máquina programável. Primeiramente, a temperatura é reduzida a -7°C . Nessa fase, ocorre a liberação do calor latente de fusão e, para evitar o prejudicial aumento de temperatura, faz-se o “*seeding*” através do contato de um objeto metálico pré-refrigerado em nitrogênio líquido com a palheta. Os embriões são submetidos a um período de equilíbrio de 10 a 15 minutos e, após, são congelados lentamente. A temperatura é reduzida gradualmente até atingir -30 a -35°C , sendo o processo de queda definido entre $0,3$ a 1°C por minuto. Nessa etapa, a célula estará com alta concentração de solutos que permitem a imersão em nitrogênio líquido evitando a formação de cristais de gelo que danificam a membrana (VAJTA & NAGY, 2006).

A vantagem desse método é a possibilidade de transferência direta para as receptoras após o descongelamento (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 1997). Porém, a formação de cristais de gelo durante o processo pode causar danos irreversíveis às células, o que ocorre em menor proporção no processo de vitrificação.

No momento do descongelamento, é essencial o rápido aquecimento para que os pequenos cristais não se fundam formando cristais maiores que provocam danos irreversíveis às membranas celulares. Os crioprotetores devem ser removidos através da passagem dos embriões criopreservados em soluções decrescentes de crioprotetores impermeáveis (WOODS et al., 2004) e posteriormente, o material biológico é reidratado em solução de manutenção (RALL, 1992).

Vitrificação

É uma técnica desenvolvida por RALL & FAHY, em 1985, com embriões de camundongos. Nessa técnica, os meios de criopreservação sofrem uma passagem rápida direta do estado líquido para o vítreo e amorfo, impedindo a formação de cristais de gelo. Isso acontece devido ao alto grau de viscosidade dos crioprotetores e à alta velocidade de congelamento pela imersão direta no nitrogênio líquido, dispensando o uso de equipamentos para redução gradual da temperatura.

A desvantagem dessa técnica está associada à alta concentração de crioprotetores utilizados, que podem levar a injúrias celulares por choque osmótico e toxicidade (VAJTA & NAGY, 2006). Em função disso, para garantir o sucesso da técnica, é necessária a utilização de um meio com alta viscosidade e concentração para que o volume final possa ser reduzido (SARAGUSTY et al., 2009)

Diversas metodologias foram desenvolvidas para execução da técnica de vitrificação, dentre elas: vitrificação convencional, OPS, grades de microscopia eletrônica de transmissão, cryoloop e cryotop.

- Vitrificação convencional

Nessa técnica, palhetas francesas de inseminação de 0,25mL são preenchidas com uma coluna de 200 μ L de solução de vitrificação, 20 μ L de meio contendo embriões e 25 μ L de solução de vitrificação nessa sequência. Essas colunas devem ser separadas por colunas de ar de aproximadamente 8mm. As palhetas são seladas e imersas em nitrogênio líquido. O tempo necessário entre a exposição ao agente crioprotetor e a inserção no nitrogênio líquido é de 30 segundos.

Para o aquecimento, as palhetas são colocadas em banho-maria a 37°C por 15 segundos e agitadas vigorosamente para misturar as colunas definidas durante o congelamento. Os embriões são transferidos para a solução de vitrificação em duas etapas: 1) meio mais concentrado por 1 minuto e 2) meio mais diluído por 5 minutos.

Para remover completamente os agentes crioprotetores, deve-se utilizar uma solução composta por H-TCM-199 + 10% de soro fetal bovino para lavar os embriões duas vezes (MARTINO et al., 1996).

- Técnica de OPS (Open Pulled Straw) ou Vitrificação em palhetas abertas

Essa técnica, desenvolvida por VAJTA et al., (1997), consiste na remoção dos tampões de algodão das palhetas de inseminação francesas de 0,25mL. A região central é aquecida e esticada manualmente para reduzir o diâmetro interno pela metade. Após, a palheta é cortada na extremidade mais estreita para o envasamento dos embriões pelo efeito capilar. O meio de vitrificação com o embrião compreende um volume de 1 a 2 μ L da porção inicial da palheta, que é imediatamente introduzida no nitrogênio líquido para que haja solidificação sem dispersão da solução.

Já o aquecimento consiste na inserção da ponta da pipeta aberta diretamente na placa contendo o meio de aquecimento. O meio vitrificado volta ao estado líquido após 1 a 2 segundos (VAJTA et al., 1998).

Esse método de vitrificação é bastante eficiente, porém há o risco de contaminação dos embriões porque o meio tem contato direto com o nitrogênio líquido (PYLES, 2003).

- Vitrificação em grades de microscopia eletrônica de transmissão

Nesse método, grades de cobre utilizadas na microscopia eletrônica são utilizadas como suporte físico para os embriões que serão submetidos à vitrificação. Desenvolvido por MARTINO et al. (1996), os embriões são expostos a um volume muito pequeno de crioprotetor (1 μ L) e em seguida, transferidos para as grades com o auxílio de uma pipeta, que são submersas diretamente em nitrogênio líquido para acelerar a curva de resfriamento.

- Cryoloop

Proposta inicialmente por LANE et al. (1999) para a vitrificação de blastocistos de ratos e de humanos, essa técnica exige a confecção de um instrumento composto por uma alça de metal presa por um laço de nylon, que será preenchido pela solução de vitrificação, onde serão colocadas os embriões, que será imerso em nitrogênio líquido para que o material seja vitrificado.

- Cryotop

O método foi primeiramente descrito por KUWAYAMA et al. (2005), como alternativa para melhor criopreservação de embriões em humanos. Nessa técnica são utilizadas hastes plásticas que recebem os embriões em pequenos volumes de crioprotetores, e são mergulhadas diretamente no nitrogênio líquido. As hastes são alojadas em palhetas de polipropileno onde ficarão acondicionadas.

O conjunto palheta haste é recoberto por uma tampa que impede o contato do material vitrificado com o nitrogênio líquido. Esse método é considerado eficiente para o congelamento de embriões bovinos e atualmente o

mais utilizado, visto que as taxas de eclosão dos blastocistos expandidos após 48 horas foram significativamente superiores com o uso dessa técnica, se comparada a utilização do congelamento clássico (DIÓGENES et al., 2012).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A eficiência da técnica pode ser mensurada oito dias após a TIFOI, onde após a lavagem uterina, compara-se o número de ovócitos transferidos com o número de estruturas recuperadas. Para determinar a taxa de recuperação, se exclui uma estrutura por ela ser referente ao ovócito da própria ovuladora, ou seja, a fêmea que recebeu os ovócitos imaturos.

Em 2016, SPRICIGO et al., relatou um experimento desenvolvido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, no qual foram obtidos ovócitos imaturos de fêmeas da raça Gir, via OPU. Esses ovócitos foram selecionados e injetados em fêmeas ovuladoras da raça Nelore. Oito dias após, fez-se a lavagem uterina desses animais e foram recuperados 11 embriões. Esses embriões foram transferidos individualmente para receptoras sincronizadas. Através do diagnóstico de gestação foram confirmadas quatro prenhezese, sendo que todas vieram a termo. Dentre os bezerros nascidos, um foi oriundo do ovócito da ovuladora, já que ele apresentava o fenótipo característico de um animal meio sangue. Além disso, a paternidade desses animais foi confirmada através de exames de DNA. Isso comprova a viabilidade da técnica, mesmo que ainda sejam necessários estudos para elevar as taxas de sucesso e posterior utilização comercial para contribuir para o progresso da tecnologia de produção de embriões no país.

Segundo os trabalhos já desenvolvidos, há hipóteses que as baixas taxas de recuperação estão relacionadas com a perda de ovócitos no momento da injeção e a redução do número de células do cumulus devido à manipulação e, conseqüentemente, menor captura de ovócitos pelo oviduto.

Considerando isso, para um melhor resultado, é essencial a injeção em folículos com no mínimo 10mm de diâmetro e 20 a 40% de vascularização. Além disso, ajustar o número de ovócitos a serem injetados para uma boa captação

pelas fímbrias do oviduto e evitar o excesso de manipulação ovariana durante o procedimento.

5. RELATÓRIO DE ESTÁGIO

5.1. Local

O estágio curricular supervisionado foi realizado na empresa “Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia” sob a supervisão do Médico Veterinário Dr. João Henrique Moreira Viana. As atividades desenvolvidas durante o período de estágio ocorreram no Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem (CES) e no Laboratório de Reprodução Animal I (LRA - I). O estágio teve início em 5/3/2018 e término em 15/6/2018, totalizando 576 horas.

O Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem (CES) ou “Fazenda Sucupira” está no Riacho Fundo II - DF, a 35km do Plano Piloto. Compreende uma área de 1.800 hectares destinados a criação de animais para o desenvolvimento de pesquisas e de raças domésticas ameaçadas de extinção: bovinos, ovinos, caprinos, equinos e suínos. Além disso, essa fazenda apresenta um Laboratório de Reprodução Animal, associado às atividades desempenhadas no curral e o Banco Brasileiro de Germoplasma Animal.

O Laboratório de Reprodução Animal I (LRA - I) está inserido no Prédio de Biotecnologia (PBI), na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), localizada no Parque Estação Biológica na Avenida W5, Asa Norte-DF. Essa unidade possui um total de 30.000m² divididos em diversos setores de pesquisa: biotecnologia, controle biológico, conservação de germoplasma, coleta e caracterização de germoplasma, quarentena de germoplasma, botânica e ecologia, entre outros.

5.2. Atividades desenvolvidas

Para que houvesse o acompanhamento do maior número de atividades, o estágio foi dividido em duas etapas: dois meses e meio na “Fazenda

Sucupira” e um mês no CENARGEN. Os procedimentos acompanhados estão listados nos quadros 1 e 2 abaixo.

QUADRO 1 – Atividades acompanhadas na Fazenda Sucupira (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-DF) durante os meses de março, abril e junho.

Atividade	Quantidade
Aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) em bovinos (animais)	120
Aspiração folicular através da técnica de laparoscopia em bezerras (animais)	96
Coleta de sangue de vacas e bezerras para dosagem hormonal (FSH e LH) (animais)	160
Avaliação do trato reprodutivo de fêmeas através de palpação retal (animais)	300
Avaliação da dinâmica folicular em bovinos pelo ultrassom com função Doppler (animais)	400
Avaliação da dinâmica folicular em bezerras pelo ultrassom com função Doppler (animais)	208
Aspiração de folículos de ovários obtidos em abatedouro (procedimentos)	3
Rastreamento e classificação de ovócitos em fluido folicular (procedimento)	3
Maturação <i>in vitro</i> (MIV), fecundação <i>in vitro</i> (FIV) e cultivo <i>in vitro</i> (CIV) (procedimento)	1
Protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) (protocolos)	5
Inseminação Artificial (IA) (animais)	20
Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI) (procedimento)	28

Coleta de embriões bovinos através de lavagem uterina em D7 e D14 (animais)	36
Transferência de Embriões (TE) em bovinos (animais)	32
Transferência de Embriões (TE) em ovinos (animais)	1
Diagnóstico de gestação em bovinos (animais)	8
Criopreservação de embriões (procedimento)	1
Congelamento de sêmen de ovinos (procedimento)	1
Avaliação biométrica de bezerras (animais)	13

QUADRO 2 – Atividades acompanhadas no Laboratório de Reprodução Animal I – LRA I (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-DF) durante o mês de maio.

Atividade	Quantidade
Aspiração de ovários obtidos em abatedouro (procedimentos)	20
Rastreamento e classificação de ovócitos em fluido folicular (procedimentos)	20
Micromanipulação para reconstrução de ovócitos criopreservados (procedimentos)	3
Coloração de embriões com Hoechst e Iodeto (procedimentos)	5
Avaliação de embriões em microscópio de fluorescência confocal (procedimentos)	2
Maturação <i>in vitro</i> (MIV), fecundação <i>in vitro</i> (FIV) e cultivo <i>in vitro</i> (CIV) (procedimentos)	35
Avaliação e identificação de clivagem em D2 (procedimentos)	20
Avaliação do desenvolvimento de blastocistos em D6, D7 e D8 (procedimentos)	15

Fixação de embriões e coloração com Lacmoide (procedimentos)	3
Atividades em PCR em tempo real (procedimentos)	2
Protocolo para extração de RNA para ovócitos, células do cumulus e embriões (procedimentos)	1

5.3. Conclusão

O estágio proporcionou vasto conhecimento prático e teórico relacionado às atividades de campo e laboratoriais essenciais para o desenvolvimento da área de Biotecnologia da Reprodução Animal, especialmente com a espécie bovina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SPRICIGO J. F., SENA NETTO S. B., MUTERLLE C. V., RODRIGUES S. DE A., LEME L. O., GUIMARAES A. L., CAIXETA F. M., FRANCO M. M., PIVATO I., DODE M. A. **Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes**. Theriogenology, v.86, p.2054-2062, 2016.

GOUDET G., BEZARD J., DUCHAMP G., PALMER E. **Transfer of immature oocytes to a preovulatory follicle: An alternative to *in vitro* maturation in the mare?** Equine Vet J 1997;Suppl. 25:54- 59.

DELEUZE, S., GOUDET, G., CAILLAUD, M., LAHUEC, C., AND DUCHAMP, G. (2009). **Efficiency of embryonic development after intrafollicular and intraoviductal transfer of *in vitro* and *in vivo* matured horse oocytes**. Theriogenology 72, 203–209.

HOELKER M., KASSENS A., SALILEW-WONDIM D., SIEME H., WRENZYCKI C., TESFAYE D., NEUHOFF C., SCHELLANDER K., HELD-HOELKER E. **Birth of healthy calves after intra-follicular transfer (IFOT) of slaughterhouse derived immature bovine oocytes**. Theriogenology, v.97, p. 41-49, 2017.

ORTIS, H. AND FOSS, R. (2013) **How to collect equine oocytes by transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration**. AAEP Proceedings, vol.59, 519-524.

KASSENS A., HELD E., SALILEW-WONDIM D., SIEME H., WRENZYCKI C.; TESFAYE D.; SCHELLANDER K.; HOELKER M. **Intrafollicular Oocyte Transfer (IFOT) of Abattoir Derived and *In Vitro*-Matured Oocytes Results in Viable Blastocysts and Birth of Healthy Calves**. Biology of reproduction, v. 92,p. 150, 2015.

FARIN PW and FARIN CE (1995) **Transfer of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*: survival and fetal development** *Biology of Reproduction*. 52 676–682.

PENITENTE FILHO, J.M. **Produção de Embriões Bovinos *in vivo* e *in vitro***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011, 21p.

SANTIN, T.R., *et al.* **Criopreservação de embriões – metodologias de Vitriificação**. *Vet. e Zootec.*, p. 561-574. V.16, n.4, dez., 2009

SPRICIGO E DODE. **Transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) em bovinos**. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.25-32, jan./mar. 2017. Disponível em www.cbra.org.br.

LEME, L.O. **Avaliação molecular e funcional de embriões bovinos produzidos *in vitro* vitrificados por *Cryotop***. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2017, 94p. Tese de Doutorado (Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2017.

MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; DE SOUSA, S. L. G.; DE MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. **Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos**. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 40, n. 2, p. 58-64, 201.

VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SIQUEIRA L. G. B. **Brazilian embryo industry in contexto: pitfalls, lessons and expectations for the future**. *Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)*; Cabo de Santo Agostinho, PE, Brazil, August 17th to 19th, 2017.

PYLES, E. S. C. S. **Criopreservação de embriões bovinos**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- FMVZ, Botucatu- SP, 2003.

DIÓGENES, M. N., SPRÍCIGO, J. F. W. DODE M. A. N. **Vitrificação por cryotop vs. congelamento clássico: efeito nas taxas de re-expansão e eclosão de embriões bovinos PIV.** Anais da XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Foz do Iguaçu/PR; 2012. p. 495.

FERREIRA, A. M. **Reprodução da Fêmea Bovina: Fisiologia aplicada e Problemas mais comuns (causas e tratamentos).** Edição do Autor, 2010.

GONÇALVES, P. B. D., FIGUEIREDO, J. R., FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** Segunda edição. São Paulo: Roca, 2008.

DALCIN, L., LUCCI, C. M. **Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.34, n.3, p.149-159, jul./set. 2010. Disponível em: www.cbra.org.br

SANTOS, K. J. G. et al. **Biotechnologias reprodutivas e fisiologia reprodutiva da fêmea bovina – conhecimento para o sucesso.** PUBVET, Londrina, V. 6, N. 36, Ed. 223, Art. 1483, 2012.

DODE, M. A. N., LEME, L. O., SPRICIGO, J. F. W. **Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.37, n.2, p.145-150, abr./jun. 2013. Disponível em www.cbra.org.br.