

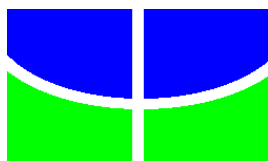
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

JULIANE LUIZ GRACIANO

Injeção Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

Brasília – DF

Julho de 2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

JULIANE LUIZ GRACIANO

Injeção Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)

**Monografia apresentada para
conclusão do curso de Medicina
Veterinária da Faculdade de
Agronomia e Veterinária da
Universidade de Brasília.**

Orientador: Prof. Dr. Ivo Pivato

Co-orientadora: Prof. Dra. Margot Alves Nunes Dode

Brasília – DF

Julho de 2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: GRACIANO, Juliane Luiz.

Título: Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI).

**Monografia apresentada para
conclusão do curso de Medicina
Veterinária da Faculdade de
Agronomia e Veterinária da
Universidade de Brasília.**

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ivo Pivato (Orientador)

Instituição: FAV/UnB

Julgamento _____

Assinatura _____

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira

Instituição: FAV/UnB

Julgamento _____

Assinatura _____

M.Sc. Ligiane de Oliveira Leme

Instituição: UnB/Embrapa Cenargem

Julgamento _____

Assinatura _____

FICHA CATOLOGRÁFICA

GRACIANO, Juliane Luiz.

Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) /Juliane Luiz Graciano; Orientação do Prof. Dr. Ivo Pivato, Brasília – DF, Universidade de Brasília (61 pág.).

Monografia – Universidade de Brasília – UnB/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2014.

1. ICSI 2. Células espermáticas 3. Ativação oocitária 4. Micromanipuladores 5. *Piezo-drill* 6. *Piezo-driven*.

I. GRACIANO., J.L. II Injeção intracitoplasmática de espermatozoides.

Cessão de Direitos

Nome do autor: Juliane Luiz Graciano.

Título da Monografia de Conclusão de Curso: Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI)

Ano: 2014

Documento formal, concedendo à Universidade de Brasília a permissão para reprodução de cópias desta monografia e para empréstimos ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos. A autora reserva para si outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito da autora.

Juliane Luiz Graciano

e-mail: julianegraciano@yahoo.com.br

Dedico esse trabalho a Deus, que sempre está presente na minha vida, mesmo nos momentos difíceis. Aos meus pais, Geraldo e Maria Luiz e todos que sempre acreditaram em mim e me deram forças em busca dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Foram muitos que me ajudaram e colaboraram com a elaboração deste trabalho e auxiliaram em meu aprendizado e desenvolvimento até a conclusão do mesmo. Meus sinceros agradecimentos, a Deus, pois sem sua ajuda, não teria sido possível a realização desse trabalho.

Primeiramente à minha família, que sempre me deram forças ao longo desse período de estudos. Em especial: meus pais Geraldo Graciano e Maria Luiz, pelo suporte e sábios conselhos; Aos meus irmãos, amigos e namorado pelo apoio e torcida constantes.

A meu orientador na UnB, Dr. Ivo Pivato, pelo apoio e disposição demonstrados sempre que eu precisei de sua orientação.

A Dra. Margot Alves Nunes Dode, pelo apoio e orientação no LRA I nas diversas atividades desenvolvidas.

Aos queridos colegas e alunos do mestrado e doutorado Ligiane, Nayara, Ana Luiza, Andriele, Catherine, Luzia, Mateus, Chico, Zezinho, Anelise e Thaís pela convivência, amizade e paciência em explicar em detalhes todas as atividades desenvolvidas durante o estágio;

No campo experimental Sucupira Assis Roberto de Bem, a Dra. Bianca e a todos os funcionários pela atenção e ensinamentos;

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
ATAB	Brometo de alquiltrimetilamônio
BSA	Albumina sérica bovina
CHX	Ciclohexamida
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
COC	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
CP	Corpúsculo polar
CSF	Fator citostático
CENARGEM	Centro Nacional de Recursos Genéticos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
g	Grama
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoide
L	Litro
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
mg	Miligrama
MI, MII	Metáfase I, Metáfase II
min	Minuto
Miv	Maturação <i>in vitro</i>
mL	mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mPBS	PBS modificado

MPF	Fator promotor da meiose
°C	Grau Celsius
PBS	Tampão salina-fosfato
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PVP	Polivinilpirrolidona
SOF	Fluido sintético de oviduto
TALP	Tyrode Albumina-Lactato-Piruvato
TCM	Meio de cultivo de tecido
VG	Vesícula Germinativa
Xg	Força gravitacional
6-DMAP	6-Dimetilaminopurina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	20
Tabela 2	53
Tabela 3	54

GRACIANO, J. L. Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI). 2014. 46p. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Medicina Veterinária) apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

RESUMO

A injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) é uma técnica de reprodução assistida que compreende uma alternativa à fertilização in vitro (FIV) convencional. Consiste na injeção de um único espermatozoide no interior do citoplasma do oócito com o auxílio de micromanipuladores. A ICSI pode ser utilizada para a obtenção de embriões em casos de problemas de infertilidade relacionados aos espermatozoides como: disponibilidade de espermatozoides em número limitado, espermatozoides imóveis ou com má morfologia. Desta forma a ICSI pode ser empregada desde animais com alto valor genético com alterações reprodutivas, na preservação de espécies em extinção, produção de animais transgênicos e de animais com sexo determinado até na reprodução assistida em humanos. Entretanto, a ativação dos oócitos bovinos após a microinjeção não ocorre adequadamente como em humanos e outros mamíferos. A aplicação de diferentes maneiras de preparo de oócitos, tratamentos de espermatozoides, ativação de oócitos e procedimentos de microinjeção no desenvolvimento embrionário são desenvolvidas com o objetivo de melhorar as taxas de fertilização. Com o uso de piezo-micromanipuladores taxas mais altas de fertilização em comparação à ICSI convencional foram conseguidas por garantir uma correta microinjeção de células espermáticas.

Palavras chave: ICSI, células espermáticas, ativação oocitaria, desnudamento, micromanipulador *Piezo-Drill* , *Piezo-Driven*.

GRACIANO, J. L. Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI). 2014. 46p. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Medicina Veterinária) apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Abstract

The intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is an assisted reproductive technique used as an alternative to conventional in vitro fertilization (IVF). This technique consists of injecting only sperm inside the oocyte cytoplasm using micromanipulators. The ICSI may be used for obtaining embryos in cases of infertility problems related to sperm, such as: sperm availability in a limited number, sperm that is unable to move or that has poor morphology. Therefore, the ICSI can be used in animals with high genetic value and reproductive alterations, in the preservation of almost extinct species, production of transgenic animals and animals with determined sex, and even in the assisted reproduction of humans. However, the activation of bovine oocytes after microinjection does not occur properly as in humans and other mammals. The different ways of preparations of these oocytes, the activation of oocytes and microinjection procedures in embryonic development are developed aiming to increase the fertilization rate. With the use of piezo-micromanipulators, higher fertilization rates were achieved in comparison to conventional ICSI due to the fact that a proper microinjection of sperm cells was guaranteed.

Key words: ICSI, sperm cells, oocyte activation, denudation, micromanipulators, *Piezo-Drill*, *Piezo-Driven*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 EVOLUÇÃO HISTÓRICA DA INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES	15
2.2 INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS	16
2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A TÉCNICA DA ICSI	17
2.4 APLICAÇÕES DA MICROINJEÇÃO DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS	20
2.4.1 Reprodução assistida em humanos	21
2.4.2 Intensificação do processo de produção de embriões <i>in vitro</i>	21
2.4.3 Produção de animais com sexo pré-determinado	22
2.4.4 Produção de animais transgênicos	23
2.5 PROCEDIMENTOS PARA REALIZAÇÃO DA MICROINJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS	24
2.5.1 Material Biológico	24
2.5.1.1 Gameta Masculino	24
2.5.1.2 Preparação dos espermatozoides para microinjeção	24
2.5.2 Gameta Feminino	25
2.5.1PREPARAÇÃO DOS OÓCITOS PARA INJEÇÃO	26
2.6 MICROMANIPULAÇÃO CONVENCIONAL <i>VERSUS</i> MICROMANIPULAÇÃO ASSISTIDA POR PIEZO	27
2.6.1 <i>Piezo-Drill</i>	29
2.6.2 <i>Piezo-Driven</i>	30
2.7 TÉCNICA DE MICROINJEÇÃO	31
2.8 ATIVAÇÃO DOS OÓCITOS MICROINJETADOS	33
2.8.1 Agentes físicos	33
2.8.2 Agentes químicos	33
2.8.2.1 Pulsos elétricos.....	33
2.8.2.2 Etanol	34
2.8.2.3 Ca-I A23187.....	34
2.8.2.4 Iomicina	35
2.8.2.5 Ciclohexamida (CHX).....	35

2.8.2.6 6-dimetil-amino-purina	35
2.8.2.7 Ditiotreitól (DDT)	35
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
4 RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO	52
4.1 Introdução.....	52
4.2 Atividades desenvolvidas.....	52
4.2.1 Rotina no LRA I.....	52
4.2.2 Rotina da Fazenda Sucupira – LRA II	53
4.2.3 Atividades desenvolvidas.....	54
4.2.4 Aspiração folicular.....	55
4.2.5 Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	56
4.2.5.1 Maturação <i>in vitro</i>	56
4.2.5.2 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	57
4.2.5.3 Cultivo <i>in vitro</i>	58
4.2.6 Vitrificação de embriões.....	59
4.2.7 Palpação retal	59
4.2.8 <i>Journal Club</i>	60
4.2.9 Ultrassonografia	60
4.2.10 Transferência de embriões	60
4.2.11 Conclusão.....	61

1- INTRODUÇÃO

A Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) é uma técnica relativamente nova, realizada pela primeira vez em 1995 por KIMURA e YANAGIMACHI como uma alternativa a fertilização *in vitro* (FIV) para tratar problemas de infertilidade decorrentes de espermatozoides imóveis, de baixa capacidade fecundante e disponível em número limitado.

Injeção intracitoplasmática de espermatozoides é útil também na produção de embriões com um sexo definido e genótipo específico (JO et al., 2014), na maximização do sêmen de alto valor (OIKAWA et al., 2001) e para produção de animais transgênicos. Além disso, é um meio eficaz para alcançar a produção *in vitro* de embriões bovinos com gametas de qualidade variável (OHLWEILER et al., 2013).

A ICSI consiste na injeção mecânica de um único espermatozoide inteiro ou do núcleo espermático isolado (cabeça) no interior do citoplasma do oócito com o auxílio de micromanipuladores visando à sua fertilização (GOTO et. al, 1990; MARTINS et al., 2001; GALLI, et.al., 2003). Além disso, outros tipos de células germinativas masculinas como as espermátides redondas e alongadas também podem ser usadas no procedimento da ICSI, pois, possuem potencial fecundante. Por isso, essa técnica representa um avanço que tem expandido as possibilidades de reprodução assistida em animais e humanos.

A ICSI é uma ferramenta fundamental de estudos para a investigação de aspectos fundamentais da fecundação e consequentemente correção da infertilidade ligada ao espermatozoide, tais como: mecanismos de interação entre gametas, ativação do oócito induzido pelo espermatozoide, e controle do primeiro ciclo celular (GALLI et al., 2003; OCK et al., 2003).

Essa revisão bibliográfica tem como objetivo a apresentação da importância da técnica de Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI) na reprodução de diferentes espécies como bovinos, equinos, humanos entre outros em casos de problemas de infertilidade ligada as

células espermáticas masculinas. Além disso, faz uma abordagem ao material biológico e equipamentos utilizados, ativação de oócitos microinjetados e fatores que influenciam a técnica.

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EVOLUÇÃO HISTÓRICA DA INJEÇÃO DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS

Os primeiros experimentos com microinjeção de células espermáticas foram realizados por HIRAMOTO (1962), que injetou espermatozoide de ouriço do mar dentro do oócito da mesma espécie. Como resultado o núcleo espermático não descondensou no citoplasma do oócito. Quando o oócito foi inseminado juntamente com a injeção espermática, o núcleo espermático injetado participou do processo meiótico. Este fato sugeriu que a ICSI por si só não promovia a ativação do oócito e consequente descondensação do núcleo espermático, sendo necessário para isso um estímulo adicional (MARTINS et al., 2001).

O primeiro experimento em mamíferos foi realizado por UEHARA e YANAGIMACHI (1976). Neste estudo foi observado que o núcleo espermático humano foi capaz de se desenvolver em pronúcleo quando microinjetado em oócitos de hamster. Estes resultados sugerem que, os fatores citoplasmáticos que controlam a transformação do núcleo espermático em pronúcleo não são espécie-específicas. A partir de então, o nascimento de várias espécies por meio da ICSI tem sido relatada (THADANI, 1980).

Os primeiros estudos em bovinos foram realizados por (WESTHUSIN et al., 1984). Como resultado foi observado a formação de pronúcleos masculino e feminino após a injeção de espermatozoides bovinos em oócitos bovinos maturados *in vitro*.

O primeiro produto oriundo de ICSI em mamíferos foi registrado por (HOSOI et al., 1988) em coelhos. Posteriormente (GOTO et al., 1990)

demonstraram que oócitos bovinos, maturados *in vitro* se desenvolveram em blastocisto após terem sido fecundados por injeção de espermatozoides considerados “mortos” por estarem imóveis, gerando bezerros normais.

Em humanos, a primeira gestação através da ICSI, foi obtida em 1992, representando a maior inovação no campo da fecundação assistida na espécie humana (PALERMO et.al., 1992).

Nos dias atuais, a ICSI consiste em um dos procedimentos mais bem sucedidos para a fecundação humana em casos de infertilidade masculina.

Entretanto a ICSI apresenta algumas peculiaridades de acordo com as espécies. Em coelhos (KEEFER, 1989), humanos (VAN STEIRTEGHEM et al., 1993), camundongos (KIMURA e YANAGIMACHI, 1995), equinos (GALLI et al., 2002), a introdução da agulha e a deposição do espermatozoide já são suficientes para induzir a descondensação da cabeça espermática, formação do pronúcleo masculino e o subsequente desenvolvimento embrionário. O mesmo não acontece com os bovinos, onde é necessária uma estimulação para que haja desenvolvimento embrionário (MATOS, 2004).

2.2 INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS

A ICSI permite o uso de espermatozoides imóveis de baixa capacidade fecundante ou disponíveis em número limitado (HEUWIESER et al., 1992). Ademais a ICSI também pode ser executada com espermatozoides do epidídimo e ejaculado, ambos com o mesmo potencial nos bovinos e humanos (GOTO et. al., 1996; MARTINS et. al., 2001). Em virtude da possibilidade de recuperação de espermatozoides do epidídimo de animais de alto valor genético que morreu a poucas horas, estes têm apresentado maior interesse porque podem ser criopreservados mantendo funcionalidade para emprego tanto na FIV quanto na ICSI. (MARTINS et. al., 2001).

Do mesmo modo, também é possível a utilização de gametas masculinos em estágios iniciais de desenvolvimento como a espermátide redonda (o mais jovem estágio haploide) e a alongada que podem se tornar um espermatozoide maduro desde que, apresentem o núcleo contendo um grupo de cromossomos haploides, podendo formar zigotos quando introduzidos dentro do citoplasma de oócitos maduros. (MARTINS et al 2001.; BARTON et al., 1991). O uso de espermátides na ICSI foi descrito em algumas espécies animais como camundongos (KIMURA et. al., 1988), hamster (OGURA e YAMAGIMACHI, 1995), bovinos (GOTO et.al., 1996) e suínos (KIM et. al., 1999).

Em virtude do tipo celular microinjetado a técnica recebe um nome diferente. A técnica de microinjeção de espermátides redondas, foi denominada de ROSNI (*round spermatid injection*, TESARIK et. al., 1995) e no caso de microinjeção de espermátides alongadas passou a se chamar ELSI (*elongated spermatid injection*, FISHEL et. al., 1995).

2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A TÉCNICA DA ICSI

Inúmeros fatores podem afetar diretamente a ICSI, pois essa técnica envolve intensa manipulação de oócitos, com constantes mudanças de meio, ficando mais expostos a variações de pH e temperatura. Além do mais essa técnica transpõe todas as barreiras naturais para a penetração do espermatozoide e elimina toda a seletividade do processo biológico de fecundação. (GORDON e LAUFER, 1998). Por outro lado, a principal vantagem da referida técnica é a possibilidade de microinjeção de vários tipos de células espermáticas desde que apresentem núcleo íntegro ou somente cabeça de espermatozoide, espermatozoide imóvel ou morto (IRRITANI, 1991) e mais recente a microinjeção de espermatozoide liofilizado (KESKINTEPE et al., 2001).

Condições desfavoráveis causadas pela pipeta de injeção como injúrias ao citoesqueleto, organelas do citoplasma e a introdução de

contaminantes biológicos podem causar perda embrionária após a transferência do embrião (IRRITANI, 1991).

Segundo TOCHARUS et al., (1996) um maior desenvolvimento embrionário foi alcançado com a utilização de pipetas de diâmetros menores em contraposição a utilização de pipetas de grande diâmetro que requerem um aumento da força mecânica adicional e um aumento de volume de solução microinjetada, podendo causar danos aos oócitos e atraso no desenvolvimento embrionário. A pipeta ideal para a microinjeção de espermatozoides bovinos deve apresentar 6-7 μm de diâmetro interno e 8-9 μm de diâmetro externo (GOTO et al., 1996).

A maturação citoplasmática é um pré-requisito para ativar os oócitos a descondensar a cabeça espermática, isso porque o citoplasma do oócito maturado apresenta um sinal para programar o desenvolvimento embrionário e transformar a cromatina espermática em pronúcleo masculino (PERRAULT, 1990). Portanto a composição do meio de maturação *in vitro* é muito importante para que os oócitos adquiram competência para a fecundação e desenvolvimento até blastocisto. Uma dessas substâncias essenciais para a maturação oocitária é a Glutathione um importante agente redutor de pontes dissulfídicas do núcleo espermático durante a fecundação que combate os danos oxidativos de radicais livres presentes no meio citoplasmático envolvido na formação do pronúcleo masculino. (FUNAHASHI et al., 1994; MIYAMURA et al., 1995; SUTOVSKY e SCHATTEN, 1997).

A dificuldade de desenvolvimento da técnica da ICSI em bovinos está relacionada com a forma do núcleo espermático (achatado e grande em tamanho) e a impossibilidade de visualizar o ooplasma sob microscopia óptica. Ademais a cromatina espermática bovina encontra-se altamente condensada devido ao maior grau de substituição de histonas por protaminas, que apresentam um maior número de ligações dissulfídicas (SELIGMAN et al., 1991; KATAYOSE et al., 1999), quando comparado com o núcleo espermático de outras espécies mamíferas. Esse fato implica em maior tempo para descondensar e desenvolver em pronúcleo masculino (QIAN et al., 1996). Portanto, a descondensação e a

formação do pronúcleo masculino após a ICSI dependem da permeabilização da membrana espermática. Alguns procedimentos adotados antes da ICSI como: a remoção da cauda e acrossoma por meios físicos como a sonificação (GOTO, 1993), imobilização do espermatozoide por congelamento e descongelamento (PERRAULT et al., 1988; CATT e RHODES, 1995), ou colisão com pipeta de injeção contra a cauda espermática (KESKINTEPE e BRACKETT, 1999) pode melhorar os resultados. Espermatozoides de hamster, coelho e peixe descondensam após injeção no interior de oócitos, sem qualquer pré-tratamento. Ao contrário, os espermatozoides dos bovinos (RALL e FAHY, 1985; KEEFER, 1989; CATT e RHODES, 1995), caprinos (KESKINTEPE et al., 1997; KESKINTEPE e BRACKETT, 1999), suínos (CATT e RHODES, 1995) e equinos (BRINGING, 1998) requerem capacitação antes da injeção para completar a liberação do material genético.

Para o sucesso no processo da ICSI duas ações são primordiais: imobilização espermática e ruptura da membrana plasmática do oócito (PAYNE, 1995).

A imobilização do espermatozoide pela pipeta de injeção tem importantes consequências para a fecundação, uma vez que o contato da pipeta com a cauda espermática promove a ruptura da membrana plasmática (DOZORTSEV et al., 1994). A lesão na cauda do espermatozoide permite a liberação de fatores citoplasmáticos, os quais induzem a descondensação da cabeça espermática (FLAHERTY et al., 1995; PAYNE, 1995). Sugere-se que esses fatores citosólicos espermáticos também são responsáveis pela ativação do oócito após a ICSI (DOZORTSEV et al., 1995).

Um dos principais pontos a serem considerados na aplicação da ICSI nos animais domésticos é sua grande variação. Essa variação consiste na habilidade dos oócitos se ativarem após a ICSI. Nos humanos, coelhos e camundongos a ativação dos oócitos depende somente do ato de injeção e deposição do espermatozoide no citoplasma (GRONDAHAL et al., 1997), porém nos bovinos menos de 20% dos

oócitos se ativam sem processos artificiais (MAHI e YANAGIMACHI, 1975; GOTO et al., 1990; CUMMINS e JEQUIER, 1994)

Representando o principal erro da fecundação após a ICSI, a inadequada ativação oocitária combinada com possíveis falhas na maturação citoplasmática *in vitro* pode resultar em baixa descondensação da cabeça espermática e decréscimo no desenvolvimento embrionário (GÓMEZ et. al., 1998).

2.4 APLICAÇÕES DA MICROINJEÇÃO DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS

Segundo OHLWEILER et al.,(2013) a comparação entre FIV e ICSI na produção de embrião demonstrou que a utilização da referida técnica pode aumentar a viabilidade de oócitos de má qualidade.

A ICSI se apresenta como uma alternativa viável aumentando significativamente as taxas de clivagem para oócitos de boa qualidade, e as taxas de blastocisto para oócitos de má qualidade, como demonstrado na tabela abaixo.

TABELA 1. Taxa de clivagem e blastocisto obtidos depois FIV e ICSI usando espermatozoides de dois touros (A e B), e oócitos de boa ou má qualidade.

Método de fertilização	Touro/ qualidade de oócito	% (N)			
		Clivagem	Blastocisto	Média Clivagem	Média Blastocisto
FIV	A/ bom	60.0(42/70) ^{c,d}	20.0(41/70) ^{c,d}	60.0(72/120) ^d	22.5(27/120) ^c
	B/ bom	60.0(30/50) ^{c,d}	26.0(13/50) ^c		
	A/ ruim	54.7(52/95) ^d	12.6(12/95) ^d	63.5(106/167) ^{c,d}	11.4(19/167) ^d
	B/ ruim	75.0(54/72) ^c	9.7(7/72) ^d		
ICSI	A/ bom	76.7(23/30) ^c	26.7(8/30) ^c	75.0(45/60) ^c	28.3(17/60) ^c
	B/ bom	73.3 (22/30) ^{c,d}	30.0(9/30) ^c		
	A/ ruim	71.4(25/35) ^{c,d}	22.9(8/35) ^{c,d}	68.7(46/67) ^{c,d}	22.4(14/67) ^c
	B/ ruim	65.6(21/32) ^{c,d}	21.9(7/32) ^{c,d}		

Abreviatura: ICSI, Injeção Intracitoplasmática de espermatozoides.

^a Oócitos com citoplasma homogêneo com nenhuma ou poucas granulações escuras e completamente cercado com mais de três camadas de células do *cumulus* compactas.

^b Oócitos com citoplasma heterogênea com várias granulações escuras, total ou parcialmente cercado com células do *cumulus* não compactas e um pouco escura.

^{c,d} Dentro de uma coluna as proporções que não tem o mesmo expoente são diferentes ($P < 0,05$).

Fonte: Adaptado de OHLWEILER et al., *Intracytoplasmic sperm injection improves in vitro embryo production from poor quality bovine oocytes*. Therio., v. 79, p. 778–783, 2013.

2.4.1 Reprodução assistida em humanos

A ICSI tem sido utilizada em humanos para o estudo dos eventos celulares oriundos da interação de gametas durante a fertilização (PERREAULT et al., 1988; GOTO et al., 1990; DORZOTSEV et al., 1997) e para pesquisas no tratamento de subfertilidade masculina. As primeiras gestações foram notificadas a partir de 1990 (PALERMO et al., 1992). Taxas de fertilização de até 80 % e taxa de gravidez clínica de 45% após a ICSI tem reduzido a necessidade de doador de esperma para inseminação ou adoção de crianças por casais com fator de infertilidade masculina grave (PALERMO et al., 1992).

2.4.2 Intensificação do processo de produção de embriões *in vitro*

A ICSI é uma importante ferramenta para a produção *in vitro* de embriões de mamíferos. Em bovinos, uma grande vantagem da ICSI reside na possibilidade de permitir o uso de espermatozoides que não seriam capazes de fertilizar o oócito pela FIV convencional. A ICSI pode desta forma ser utilizada quando um pequeno número de espermatozoides está disponível ou quando estes se apresentam

imóveis, sem cauda ou com lesões de membrana (PARRISH et al., 1986; GOTO et al., 1996; CATT et al., 1996; HAMANO et al., 1999).

A ICSI também torna possível a utilização de gametas masculinos em estágios iniciais de desenvolvimento. O uso de espermátide ou núcleo de espermátide para produção de blastocistos por meio da ICSI foi descrito em algumas espécies de animais domésticos como hamster (OGURA e YANAGIMACHI, 1993); bovinos (GOTO et al., 1996). camundongos (KIMURA et al., 1998) e suínos (KIM et al., 1999) Associada à punção folicular (OPU) guiada por ultrassom para a produção *in vitro* de embriões bovinos, a ICSI poderá ser utilizada como uma alternativa para que sejam alcançadas altas taxas de desenvolvimento embrionário (OIKAWA et al., 2001).

Além disso, a ICSI pode trazer aplicações promissoras no campo da reprodução de animais em risco de extinção, onde a fertilização *in vitro* ainda não foi estabelecida para a obtenção de bons resultados.

Contudo, na literatura, há relatos de que as taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos microinjetados são mais baixas que as de outras espécies. Taxas de fecundação sem ativação química dos oócitos são particularmente altas em humanos (40 a 70%) (DEVROEY et al., 1994; LUNDIN et al., 1994), mas inferiores a 20% em alguns trabalhos realizados na espécie bovina (WESTHUSIN et al., 1984; KEEFER et al., 1990; GOTO et al., 1990). Assim, em contraste à reprodução assistida em humanos, a ICSI em bovinos ainda não alcançou aplicação prática, devido à baixa eficiência na produção de gestações e nascimentos por meio desta técnica em relação à FIV convencional.

2.4.3 Produção de animais com sexo pré-determinado

A associação da ICSI com a sexagem de espermatozoides tem sido objeto de estudo em bovinos, demonstrando vir a ser uma alternativa promissora para a produção *in vitro* de embriões sexados de animais domésticos (MEDVEDEV et al.,1997; HAMANO et al., 1999; SEIDEL et al., 1999). O controle da razão de nascimento entre machos e fêmeas,

obtendo-se animais de sexo selecionado de acordo com as necessidades produtivas de cada setor, contribuirá para a intensificação do processo de melhoramento genético ou produção comercial.

Um trabalho divulgado por JO et al., (2014) demonstrou a eficiência da produção de embriões de fêmeas bovinas e a capacidade de desenvolvimento *in vitro* a partir da técnica de ICSI com o sêmen bovino selecionado por citometria de fluxo (ssICSI) e indiferenciados (usICSI). Para efeitos de comparação, embriões bovinos também foram produzidos por fertilização *in vitro* (FIV) com sêmen ordenada (ssIVF) e indiferenciados (usIVF). O sêmen utilizado neste estudo era de um touro escolhido por sua alta fertilidade e capacidade de desenvolvimento de blastocisto. Os resultados demonstraram que as taxas de formação de pronúcleo e as taxas de clivagem no grupo ssIVF (23,1% e 43,6%) foram menores do que nos grupos de usIVF (71,1% e 71,6%), usICSI (73,1% e 92,8%) e ssICSI (75% e 79,1%), respectivamente ($P < 0,05$). Além disso, a taxa de formação de blastocistos no grupo ssIVF foi menor do que nos grupos de usIVF, usICSI, e usICSI (2,7% versus 30,2%, 28,7% e 24,7%, respectivamente, $P < 0,05$). A taxa de formação de blastocistos no grupo ssICSI foi semelhante à do grupo usICSI o que indica que a ICSI pode resgatar o dano ocasionado ao sêmen por citometria de fluxo. Na avaliação da qualidade do embrião pela contagem do número de células normais e apoptóticas, verificou-se que, apesar do fato de que a taxa de formação de blastocistos no grupo ssIVF foi significativamente inferior a taxa dos grupos usIVF, usICSI e ssICSI, não houve diferença em números totais e apoptose de células entre esses grupos ($P > 0,05$). Por fim, a análise de cariótipo demonstrou que a porcentagem de embriões do sexo feminino nos grupos ssICSI e ssIVF foi de 100%, ao passo que era de 58,8% e 57,8% no usIVF. Em conclusão, a ICSI com citometria de fluxo ordenado de sêmen bovino fornece uma abordagem alternativa para a produção de embriões com sexo pré-determinado (JO et al., 2014).

2.4.4 Produção de animais transgênicos

A ICSI tem sido aplicada com sucesso na produção de animais transgênicos como camundongos (PERRY et al., 1999), sendo o espermatozoide utilizado como o carreador de fragmentos de DNA exógeno. Neste caso, o espermatozoide é tratado para permeabilização da membrana por meios físicos ou químicos, antes da incubação com plasmídeos de DNA, sendo as cabeças isoladas de espermatozoides microinjetadas junto com o DNA exógeno para a fertilização dos oócitos (GANDOFI et.al., 2000).

2.5 PROCEDIMENTOS PARA REALIZAÇÃO DA MICROINJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS

2.5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

2.5.1.1 GAMETA MASCULINO

Podem ser utilizados diferentes tipos espermáticos para promover a fecundação do oócito na ICSI, dentre eles espermatozoides maduros, espermatozoides imaturos e células sem diferenciação, como as espermatídes que podem ser obtidos respectivamente do ejaculado, do epidídimo e testículo de bovinos, sendo apenas necessário que o núcleo destas células esteja viável, ou seja, a cabeça do espermatozoide não deve apresentar alterações morfológicas. Consequentemente no procedimento de ICSI podem ser utilizados espermatozoides que apresentem defeitos de cauda não interferindo negativamente no procedimento da técnica uma vez que, durante a técnica tem-se o corte da cauda.

2.5.1.2 PREPARAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES PARA A MICROINJEÇÃO

Podem ser utilizados espermatozoides recém-colhidos ou congelados. O descongelamento das palhetas com sêmen é realizado em banho-maria, com água a temperatura de 37°C por 20 segundos.

A seleção dos espermatozoides viáveis pode ser feito por sonificação ou centrifugação. O processo de sonificação consiste em aplicação de energia ultrassônica de alta intensidade por um disruptor de células (UNIQUE) que transforma a energia elétrica em mecânica. A potência desta energia mecânica causa o rompimento das células. (KEEFER, 1989; GOTO, 1993) .

Já o procedimento de centrifugação é feito em gradiente de *Percoll* 45/90%. Nesse caso a cauda dos espermatozoides deve ser cortada pela aplicação de um impulso piezo durante o procedimento de microinjeção. Esse fato aumenta a taxa de fecundação, por liberação de fatores citosólicos (MATOS, 2004).

Os espermatozoides selecionados são capacitados através da incubação com heparina (20 µL/ml) a 38,5°C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂ durante 15 minutos antes de serem utilizados na ICSI (JO et al., 2014).

No entanto, antes da microinjeção dessas células é necessário uma avaliação quanto a sua estrutura nuclear. A técnica empregada é a observação da cromatina espermática, por meio do uso de um corante tricíclico heteroaromático que, se intercala a dupla hélice do DNA sob a forma de monômeros, ou de agregado quando o DNA encontra-se danificado. Quando há formação de monômeros visualiza-se coloração verde, enquanto se estiver danificado vai apresentar coloração vermelha (MARTINS et al., 2001).

2.5.2 GAMETA FEMININO

Os oócitos a serem empregados na ICSI podem ser obtidos de vacas vivas através da técnica de *ovum pick-up* ou podem advir de ovários de animais de abatedouros. No entanto todos os oócitos devem passar por um período de maturação *in vitro* (MIV) de 22 a 24 horas antes do processo de microinjeção.

2.5.2.1 PREPARAÇÃO DOS OÓCITOS PARA INJEÇÃO

Após o período de maturação (MIV) o complexo de células do *cumulus*-oócito (COCs) deve ser lavado em hialuronidase. Após, devem ser pipetados cuidadosamente para a retirada das células do *cumulus*. Após a retirada das células do *cumulus* os oócitos são lavados e mantidos em meio de bancada (TCM 199 com sais de Hank's, sais de HEPES, SFB e antibióticos) cobertos com óleo mineral. Em seguida, os oócitos que apresentarem o primeiro corpúsculo polar no espaço perivitelínico são selecionados e separados em outra gota de meio de bancada. Para a microinjeção são usados apenas os oócitos que apresentarem o primeiro corpúsculo polar (MARTINS et al., 2001).

Embora o desnudamento dos oócitos seja necessário para a ICSI, esse procedimento influencia negativamente a capacidade de desenvolvimento dos embriões. (SIRARD, 1988; COX et al., 1993; HASHIMOTO et al., 1998).

As células do *cumulus* apresentam efeitos positivos durante as fases iniciais de fecundação e desenvolvimento embrionário, diretamente no processo de capacitação espermática e reação acrossomal (FUKUI, 1992). Indiretamente atuam na redução de radicais livres presentes no meio (HASHIMOTO et al., 1998). Portanto, apesar do procedimento de ICSI não ser feito com a presença de células do *cumulus* para facilitar a penetração dos espermatozoides, o método de desnudamento pode ter efeitos deletérios para o desenvolvimento do embrião em virtude das possíveis ações das enzimas empregadas e ou pela ação física utilizada para a remoção das células (MATOS, 2004).

Além do desnudamento, outro procedimento realizado para o preparo dos oócitos para a manipulação é a centrifugação, que tem como objetivo tornar o citoplasma mais claro, permitindo a visualização da pipeta e do local de deposição do espermatozoide durante a ICSI (CHUNG et al., 2001). Já foi demonstrado que a centrifugação exerce pouco efeito deletério no desenvolvimento dos zigotos. (WALL et al., 1985) podendo, no entanto, causar ativação partenogenética dos oócitos

quando realizada a altas velocidades, acima de 10.000x g (CHUNG et al., 2001)

Os oócitos selecionados para o procedimento de ICSI devem apresentar o primeiro corpúsculo polar (CP). A presença do corpúsculo polar é importante para a localização da placa metafásica e introdução da pipeta (PALERMO et al., 1996). Além disso, a presença do primeiro CP é um parâmetro para avaliação do sistema de maturação *in vitro*. No entanto essas características não garantem a capacidade de desenvolvimento embrionário (MATOS, 2004).

2.6 MICROMANIPULAÇÃO CONVENCIONAL VERSUS MICROMANIPULAÇÃO ASSISTIDA POR PIEZO

A Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI) tem sido uma técnica empregada em todo o mundo, desde que UEHARA e YANAGIMACHI (1976) apresentaram sua aplicação. Desde então, pipetas de injeção com um bisel têm sido amplamente utilizadas para este procedimento. As pipetas de manipulação são produzidas utilizando capilares de *borosilicato* (MARTINS et al., 2001).

Em 1995, um método usando pipeta impulsionado - PIEZO foi aplicado aos oócitos de ratos que foram facilmente rompidos e relatou-se uma alta taxa de sucesso (KIMURA e YANAGIMACHI, 1995). Na técnica de PIEZO-ICSI um dispositivo é utilizado para promover a inserção de uma agulha no interior do oócito por movimentos piezo-elétricos.

Este método faz a ICSI mais eficiente em comparação com a introdução convencional da agulha, especialmente para equinos onde o oolema é de difícil penetração. Melhores resultados têm sido relatados em humanos (YANAGIDA et al., 1999) , vacas (DEVITO et al., 2010), quando a ICSI com Piezo foi comparada com a ICSI convencional.

Além do mais, a aplicação do Piezo resultou em maiores taxas de ativação, fecundação e desenvolvimento embrionário após a ICSI em equinos, por garantir uma correta microinjeção do espermatozoide,

eliminando a maior parte dos problemas da técnica na espécie (HINRICHIS 2005).

Durante a ICSI é importante o rompimento da membrana do espermatozoide antes da injeção, garantindo que os fatores citosólicos, essenciais para a ativação do oócito sejam liberados (DEVITO et al., 2010; HINRICHIS, 2005).

Em humanos e em outras espécies de mamíferos, a ativação oocitária que ocorre nos oócitos microinjetados é mediada por um fator espermático ativador do oócito (SAOAF) supostamente liberado após o início da descondensação espermática (TESARIK et al., 1994, RYBOUCHKIN et al., 1995; PARRINGTON et al., 1996). A liberação do SAOAF estaria condicionada a danos da membrana espermática que favoreceriam a sua liberação para o oócito, uma vez que não ocorre na ICSI a fusão de membrana do espermatozoide e a membrana plasmática do oócito (SWANN et al., 1994).

Em bovinos acredita-se que o espermatozoide tenha o mesmo fator espermático (SAOAF) que os espermatozoides de outras espécies (PARRINGTON et al., 1996; KATAYOSE et al., 1999), porém, é possível que a concentração deste fator varie entre as células ou que a sua liberação seja de alguma forma comprometida em bovinos pela ICSI. Entretanto (DOZORTSEV et al., 1997) propuseram, a existência de um fator de descondensação do núcleo espermático (SNDF), uma substância presente no oócito com participação na descondensação do núcleo do espermatozoide após a sua penetração. De forma semelhante ao mecanismo sugerido para a ação do SAOAF, foi proposto que a membrana do espermatozoide deveria sofrer uma lesão parcial antes da microinjeção, para o SNDF entrar em contato com o núcleo do espermatozoide e, assim, ocorrer à liberação do SAOAF (MATOS, 2004).

2.6.1 Piezo-Drill

O *Piezo-Drill* é uma ferramenta que provoca um impacto inercial e foi desenvolvida para uso em procedimentos como a ICSI, Transferência Nuclear e outras técnicas transgênicas.

O *Piezo-Drill* produz pulsos elétricos que percorrem longitudinalmente a pipeta e faz a ponta da mesma vibrar. Esses pulsos são a chave para a perfuração da zona pelúcida e oolema com maior sucesso, garantindo melhores resultados nos procedimentos de ICSI e transferência nuclear (TN) para muitos tipos de oócitos incluindo rato, bovino, ovino, suíno, equinos e humanos.

As vantagens apresentadas pela técnica do *Piezo-Drill* decorrem de melhores taxas de sobrevivência de oócitos porque este é um método menos traumático do que o tradicional. Além disso, o oolema pode ser penetrado sem aspiração reduzindo vazamento do ooplasma. Ademais, fornece a garantia de que o oolema foi perfurado, por isso há maiores taxas de fertilização em procedimentos de ICSI.

Por outro lado, a utilização do *Piezo-Drill* apresenta limitações dentre as quais se podem destacar a toxicidade do mercúrio e os danos para a membrana celular decorrentes da amplitude das oscilações da ponta da pipeta de injeção.

Em bovinos o diâmetro interno e externo das pipetas de fixação de oócitos ideal é de 6-7 μm e 8-9 μm respectivamente, no caso da ICSI convencional. As pipetas de fixação de oócitos deve ter um diâmetro interno menor que o oócito e o diâmetro externo deve ser maior que o oócito. Se o diâmetro interno do capilar é muito grande ele pode causar deformações no oócito. Do mesmo modo se o diâmetro externo do capilar é muito pequeno não vai ser capaz de fixar o oócito para a penetração da zona pelúcida (MARTINS et al., 2001).

O capilar de penetração do oócito é carregado com 2 μL de mercúrio. O uso do mercúrio permite a penetração do capilar na zona pelúcida e oolema devido a explosão de pressão que é causada pelo abrupto movimento axial da coluna de mercúrio (KIMURA e YANAGIMACHI., 1995; FAN et al., 2006).

Entretanto oscilações laterais da ponta do capilar também acontecem quando os impulsos piezo-elétricos são aplicados o que interfere negativamente no procedimento (EDIZ e OLGAC., 2005; GAN et al., 2008). Nesse caso a utilização do mercúrio no capilar é destinada a suprimir as oscilações laterais indesejadas para melhorar a eficiência de perfuração.

Quando a penetração do oolema é bem sucedida tem-se um rápido relaxamento do mesmo. Os espermatozoides devem ser injetados rapidamente, pois quando tem um atraso na injeção há degradação dos fatores de ativação dos oócitos liberados pelos espermatozoides.

2.6.2 *Piezo-Driven*

HUANG et al., 2011 iniciaram um estudo em embriões de peixe-zebra usando um novo sistema de injeção de células o *Piezo-Driven*. Esse sistema utiliza de vibração de ultrassom para o processo de microinjeção. Esse novo equipamento apresenta vantagens em relação a tecnologia tradicional porque utiliza força de ultrassom para penetrar a membrana celular. O *piezo-driven* centraliza o poder de oscilação na pipeta injetora através de uma pilha piezo localizada perto da pipeta injetora, isso reduz o efeito de vibração na ponta lateral da pipeta de injeção a níveis satisfatórios mesmo sem a coluna de mercúrio. Por conseguinte a força de injeção necessária da pipeta injetora é menor, o que ajuda muito no controle de injeção de células. Ademais há diminuição na deformação da célula durante a injeção, reduzindo o dano às células. Além do mais, com o emprego adequado de frequência e amplitude são reduzidas as oscilações laterais da ponta da pipeta injetora. Outro sim, a retirada do mercúrio torna a proposta atraente em larga escala para a aplicação na ICSI (HUANG et al., 2011).

2.7 TÉCNICA DE MICROINJEÇÃO

Um dos fatores mais importantes para o sucesso da ICSI é o método de microinjeção do espermatozoide. Os espermatozoides a serem microinjetados são preparados em suspensão de polivinilpirrolidona (PVP). O PVP promove aumento da viscosidade do meio, causando uma redução de motilidade dos espermatozoides facilitando a sua aspiração e imobilização pela pipeta. Ademais o PVP reduz a aderência dos espermatozoides nas paredes da pipeta, facilitando o processo de aspiração e deposição do espermatozoide no oócito. Entretanto foi provado que o PVP pode causar a estabilização da membrana do espermatozoide afetando a formação do pronúcleo masculino ou ainda quando injetado em grande quantidade pode impedir o contato com as substâncias do citoplasma responsáveis pela descondensação do espermatozoide (MATOS, 2004).

Após serem examinados em gotas de PVP um espermatozoide com morfologia normal e que se movimenta lentamente na placa de Petri é selecionado. Após a seleção do espermatozoide a pipeta de injeção é posicionada acima da porção média da cauda do espermatozoide, encostada e tracionada, imobilizando-o no fundo da placa. Após o espermatozoide imobilizado é aspirado pela cauda para dentro da pipeta. O gameta masculino deve ficar posicionado próximo à abertura da pipeta de injeção para evitar a entrada de grande quantidade de PVP no interior do oócito (MATOS, 2004).

Para a microinjeção é necessário posicionar o oócito, usando a pipeta de fixação, horizontalmente por meio de leve sucção, de forma que o primeiro corpúsculo polar fique na posição 6 ou 12 horas. Assim evita-se que a pipeta cause lesão na placa metafásica, pois na maioria das vezes a placa metafásica está próxima ao CP, o que causaria dificuldade para a extrusão do segundo corpúsculo polar (KIMURA e YANAGIMACHI, 1995; PAYNE, 1995).

Após isso a pipeta de injeção contendo apenas um espermatozoide ou espermátide é transferida da gota de gametas masculinos para a gota que contém o oócito. Na ICSI convencional a pipeta de injeção é colocada com a ponta direcionada para a posição de 3

horas em relação ao CP. Em seguida a pipeta de injeção é empurrada contra a zona pelúcida (ZP), até perfura-la e estar situada dentro do oócito. Para garantir que houve rompimento da membrana plasmática e que o espermatozoide seja depositado no local certo uma pequena quantidade do citoplasma do oócito deve ser aspirado para dentro da pipeta, indicando que a membrana se rompeu. Em seguida o citoplasma deve ser empurrado lentamente para dentro do oócito juntamente com o gameta masculino. Logo após a pipeta de injeção é retirada do oócito e o local da perfuração da membrana plasmática assume sua configuração original (MARTINS et al., 2001).

Com o advento do equipamento denominado de piezo- elétrico por KIMURA e YANAGIMACHI (1995) houve um aumento da taxa de sobrevivência de oócitos de camundongos de 16% para 80% e da taxa de fertilização de 8% para 80%. Esse equipamento provoca pulsos transmitidos à pipeta de injeção que promovem a perfuração da zona pelúcida e da membrana plasmática, com pouca distorção da célula. (KIMURA e YANAGIMACHI, 1995). Mais tarde esse equipamento foi utilizado na ICSI em bovinos e humanos, resultando em altas taxas de sobrevivência e formação de pronúcleos, sem necessidade da aspiração do citoplasma para a deposição do espermatozoide no interior do oócito (HUANG et al., 1996; YANAGIDA et al., 1999; HORIUCHI et al., 2000).

2.8 ATIVAÇÃO DOS OVÓCITOS MICROINJETADOS

A ativação artificial do oócito após a ICSI é necessária uma vez que a microinjeção de espermatozoides e a estimulação mecânica promovida pela introdução da pipeta de injeção não são suficientes, em mais de 90% dos casos para ativar os ovócitos bovinos (KEEFER et al., 1990)

A ativação de oócitos dos mamíferos pode ser induzida por diversos estímulos, incluindo etanol (NAGAI, 1987; MINAMIMASHI et al.,

1993; HAMANO et al., 1999; HORIUCHI et al., 2000), ionomicina (SUSKO-PARRISH et al., 1994), ciclohexamida (YANG et al., 1994; PRESICCE e YANG., 1994), 6-dimetilaminopurina (FULKA et al., 1991) e corrente elétrica (WARE et al., 1989; PROCHAZKA et al., 1993), entre outros.

Para ser considerada fisiológico, a estimulação do oócito deve resultar na geração de Ca^{+2} e dar início a outros eventos associados à ativação.

2.8.1 Agentes Físicos

Com o objetivo de melhorar as taxas de formação de pronúcleo e clivagem dos oócitos microinjetados são aplicados tratamentos físicos como: microinjeção de espermatozoides com o uso da pipeta de injeção de células espermáticas e a estimulação mecânica promovida pela introdução da pipeta de injeção (KEEFER et al., 1990).

2.8.2 Agentes Químicos

2.8.2.1 Pulsos elétricos

Os pulsos elétricos promovem uma alteração da permeabilidade da membrana plasmática do oócito, levando a difusão de cálcio extracelular para o interior do citoplasma. Desta forma ocorre um aumento de cálcio intracelular que promove a ativação oocitária (ZIMMERMANN e VIENKEN, 1982).

Ao contrário de outras espécies animais, as células dos bovinos são sensíveis aos pulsos elétricos e um aumento nos parâmetros de pulsos elétricos pode causar dano ao fuso meiótico, levando a separação anormal de cromatina com formação de vários pronúcleos (SOLOY et al., 1997).

2.8.2.2 Etanol

O etanol promove a formação de um único pico de cálcio intracelular, de curta duração, que promove a destruição do fator citostático (CSF), levando à ativação do oócito (PRESICCE e YANG., 1994). A utilização do etanol para ativação de oócitos bovinos gerou taxa de ativação de 25-49%. Quando o etanol foi combinado com o uso de ciclohexamida para incubação a taxa de ativação dos oócitos foi de 99% (YANG et al., 1994).

2.8.2.3 Ca-I A23187

Ionóforos de cálcio são substâncias lipossolúveis que se ligam a certos íons, transferindo-os através da membrana plasmática para o interior do oócito.

A molécula de cálcio ionóforo (Ca-I A23187) transporta 2 íons de H^+ do oócito para o meio extracelular, gerando ao mesmo tempo uma corrente de íons Ca^{+2} para o interior do oócito. O pico de cálcio promove a ativação de processos proteolíticos causando a degradação da ciclina B e a redução da atividade do fator promotor da meiose (MPF) (WANG et al., 1998). Melhores resultados são observados quando a molécula de Ca-I é associada a outras substâncias que inibem a atividade do MPF como a ciclohexamida (SUTTER et al., 2000).

2.8.2.4 Ionomicina

A ionomicina é um ionóforo de cálcio que promove a retomada da meiose. A ionomicina aumenta o número de estimulações o que promove uma melhor ativação dos oócitos. Sua combinação com a 6-Dimetilaminopurina (6-DMAP) promove altas taxas de ativação e clivagem (RHO et al., 1998).

2.8.2.5 Ciclohexamida (CHX)

A ciclohexamida é uma tetraciclina inibidora da síntese de proteína de células eucarióticas. Ela atua sobre a peptidiltransferase e interrompe a síntese proteica. Dessa forma inibe a síntese de CSF pelo oócito e o MPF permanece inativado (PRESICCE e YANG, 1994). A CHX é usada normalmente para a completa inativação do MPF (SOLOY et al., 1997).

2.8.2.6 6-Dimetilaminopurina

A 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) é um inibidor específico da fosforilação proteica. O 6-DMAP causa ativação dos oócitos pela desfosforilação do MPF (LIU e WANG., 1997). Bons resultados de ativação de oócitos bovinos têm sido obtidos pela combinação de Ca-I ou ionomicina com 6-DMAP. Por outro lado, o uso de inibidores proteicos para a ativação pode impedir a extrusão do segundo corpúsculo polar ou a singamia, levando a alterações de cariótipo (KING et al., 1988; FUKUI et al., 1992; WINGER et al., 1997; RHO et al., 1998).

2.8.2.7 Ditiotreitól (DDT)

O DDT é um agente químico que quando combinado com outros agentes químicos como o Triton X-100 e alquiltrimetilâmonio (ATAB) aumentam a descondensação dos espermatozoides, porém com possíveis danos aos cromossomos paternos (HAMANO et al., 1999; SZCYGIEL e WARD, 2002).

Após o período de ativação, os ovócitos são incubados em PBS com BSA (6mg/ml) para bloquear o processo de ativação. Em seguida os oócitos são lavados em meio SOF e colocados em meio de cultivo por um período de 7 dias (MARTINS et al., 2001).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTON, S.C., FERGUNSON-SMITH, A.C., FUNDELE, R., SURANI, A.Z. **Influence of paternally imprinted genes on development.** Development, v. 113, p. 679-688, 1991. **BRINGING High-tech to horse breeding.** Science, v. 280, p. 207, 1998.

CATT, J. W. **Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and related technology.** An.Reprod. Sci., v. 42, p. 239-50, 1996.

CATT, J.W., RHODES, S.L. **Comparative Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) in human and domestic species.** Reprod. Fertil. Dev., v. 7, p. 161-7, 1995.

CHUNG, J.T., KEEFER, C.L., Downey, B.R. **Activation of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection (ICSI).** Therio., v. 53, p. 1273-84, 1999.

CHUNG J-T, DOWNEY BR, CASPER RF, CHIAN R-C. **Effect of centrifugation on early embryonic development and parthenogenetic activation of bovine oocytes matured *in vitro*.** Reprod Fertil Dev., v. 13, p. 283-388, 2001.

COX JF, HORMAZÁBAL J, SANTA MARIA A. **Effect of the cumulus on *in vitro* fertilization of bovine matured oocytes.** Therio., v.40, p. 1259-1267, 1993.

CRAN DG, JOHNSON LA, POLGE C. **Sex selection in cattle: a field trial.** Vet Rec, 136: 495-496, 1995

CUMMINS, J.M., JEQUIER, A.M. **Treating male infertility needs more clinical andrology, not less.** Hum Reprod Update, v. 9, p. 1214-19, 1994.

DEVITO LG, FERNANDES CB, BLANCO IDP, TSURIBE PM, LANDIM ALVARENGA FC. **Use of Piezo drill for intracytoplasmic sperm injection into**

cattle oocytes activated with ionomycin associated with roscovitine. Reprod Dom Anim , v. 45, p. 654:8, 2010.

DEVROEY P, LIU J, NAGY Z, TOURNAEY II, SILBER SJ, VAN SAC. **Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection.** Fertil Steril., v. 62, p. 639-641, 1994.

DOZORTSEV, D., RYBOUCHKIN, A., De SUTTER, P., QIAM, C., DHONT, M. **Human oocyte activation following intracytoplasmic injection: the role of the sperm cell.** Hum. Reprod., v.10, p.403-7, 1995.

EDIZ. K, et al., **Effect of Mercury Columan on the Microdynamics of the Piezo-Driven Pipettes**, J. of Biomechanical Engineering, vol. 127, p. 531-535, 2005.

FAN. M et al., **Vibration study of piezodriven pipettes immersed in viscous liquids,**" 100(7), 2006.

FISHEL, S. GREEN, S., BISHOP, M. **Pregnancy after intracitoplasmic injection of spermatid.** Lancet., v.345, p.1641-42, 1995.

FLAHERTY, S.P., PAYNE, D., SWANN, N.J., MATTHEWS, C.D. **Assessment of abnormal fertilization and fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection (ICSI).** In: Intracytoplasmic sperm injection: the revolution in male infertility. Reprod. Fertil. Dev., v.7, p.197-210, 1995.

FULKA J, LEIBFRIED-RUTLEDGE ML, FIRST NL. **Effect of 6.DMAP on germinal vesicle breakdown of bovine oocytes.** Mol Reprod Dev., v. 29, p. 379-384, 1991.

FUKUDA Y, ICHIKAWA M, NAITO M, TOYODA Y. **Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage.** Biol Reprod., v.42, p. 114-119, 1990.

FUKUI Y, FURUDATE M, SATO N, IWAZUMI Y, OHSAKI K. (1992) **Parthenogenetic development of bovine oocytes treated with ethanol and cytochalasin B after *in vitro* maturation.** Mol Reprod Dev., v. 33, p. 357-362, 1992.

FUNAHASHI H, CANTLEY TC, STUMPF TT, TERLOW SL, DAY BN. (1994) **Use of low-salt culture medium for *in vitro* maturation of porcine oocytes is associated with elevated glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after *in vitro* fertilization.** Biol Reprod., v. 51, p. 633-639, 1994.

GALLI, G., DUCHI, R., GROTTI, G., TURINI, P., PONDERATO, N., COLLEONI, S., LAGUTINA, I., LAZZARI, G. (2003) **Bovine embryo technologies.** Theriog., v.59, p. 599-616, 2003.

GALLI C, CROTTI G, TURINI P, DUCHI R, MARI G, ZAVAGLIA G, DUCHAMP G, DAELS P & LAZZARI G .**Frozen-thawed embryos produced by ovum pickup of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse.** Therio.,v. 58, p. 705–708, 2002.

GALLI C, MACLELLAN LJ, CROTTI G, TURINI P, PONDERATO N, DUCHI R, MARI G, MERLO B, BARBACINI S & LAZZARI G . **Development of equine oocytes matured in vitro in different media and fertilised by ICSI.** Therio., v. 57, p. 719, 2002

GAN, Y. et al. , **Um Estudo do processo de perfuração zona de injeção intracitoplasmática de espermatozoides piezo-driven .**104 (4) , 2008.

GANDOLFI F. **Sperm-mediated trasngenesis.** Therio.,v. 53, p.127-137, 2000.

GÓMEZ, M.C., CATT, J.W., EVANS, G., MAXWELL, M.C. **Sheep oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI)**. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.10, p.197-205, 1998.

GORDON, I.; LU, K. H. **Production of embryos in vitro and its impact on livestock production**. Dublin: University College Dublin, v. 33, n.1, p.77-87, jan. 1990.

GORDON, J.W., LAUFER, N. **Application of micromanipulation to hamster in vitro fertilization**. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer.*, v. 5, p.57-60, 1998.

GOTO, K., KINOSHITA, A., TAKUMA, Y., OGAWA, K. **Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa**. *Vet. Rec.*, v.127,p.517-20, 1990

GOTO K, KINOSHITA A, NAKANISHI Y, OGAWA K. (1996) **Blastocyst formation following intracytoplasmic injection of in vivo or in vitro derived spermatids into bovine oocytes**. *Therio.*,v. 45, p. 301, 1996 (abstr.).

GOTO K. **Bovine microfertilization and embryo transfer**. *Mol Reprod Dev*,36,. 288-290,1993.

HAIBO HUANG & JAMES K. MILLS & CONG LU & DONG SUN. **A universal piezo-driven ultrasonic cell microinjection system**. 2011.

HAFEZ, E. S. E. HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2003.
HAMANO, K-I., LI, X., QIAN, X-Q., FUNAUCHI, K., FURUDATE, M., MINATO, Y. **Gender preseletion in cattle with intracytoplasmically injected, flow cytometrically sorted heads**. *Biol. Reprod.*, v.60, p.1194-97, 1999.

HASHIMOTO S, SAEKI K, NAGAO Y, MINAMI N, YAMADA M, UTSUMI K. **Effects of cumulus cell density during in vitro maturation on the**

developmental competence of bovine oocytes. Therio.,v. 49, p. 1451-1463, 1998.

HEUWIESER W, YANG X, JIANG S, FOOTE RH. **Fertilization of bovine oocytes after microsurgical injection of spermatozoa.** Therio., v. 38, p. 1-9, 1992.

HINRICHS K, CHOI YH, LOVE CC, CHUNG YG, VARNER DD. **Production of horse foals via direct injection of roscovitine-treated donor cells and activation by injection of sperm extract.** Reprod., v. 131, p.1063–72, 2005.

HOSOI, Y. MIYAKE, M. UTSUMI, K. IRITANI, A. **Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoon.** Proc. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. v. 3, p.331-3, 1988.

HORIUCHI, T., EMUTA, C., OIKAWA, T., NUMABE, T. **Comparison of bovine embryo yield following intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization in individual bulls.** Therio., v.53(1), p.393, 2000.

HUANG T, KIMURA Y, YANAGIMACHI R. (1996) **The use of piezo micromanipulation for intracytoplasmic sperm injection of human oocytes.** J Assist Reprod Genetics, 13: 320-328.

HINRICHS K, CHOI YH, LOVE CC, CHUNG YG, VARNER DD. **Production of horse foals via direct injection of roscovitine-treated donor cells and activation by injection of sperm extract.** Reproduction 2005;131:1063–72.

IRITANI, A. **Micromanipulation of gametes for in vitro assisted fertilization.** MolReprod. and Devel., v.28, p.199-207, 1991.

JO, J.- L. Bang. **Production of female bovine embryos with sex-sorted sperm using intracytoplasmic sperm injection: Efficiency and in vitro developmental competence.** Therio., v. 81, p. 675-682, 2014.

JOHNSON LA, WELCH GR. **Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency.** Therio., v.52, p.1323-1341, 1999.

KATAYOSE H, YANAGIDA K, SHINOKI T, KAWAHARA T, HORIUCHI T, SATO A. **Efficient injection of bull sperm into oocytes using a Piezo-Driven pipette.** Therio, v. 52, p. 1215-1224, 1999.

KESKINTEPE, L., HASAN, A, KHAN, I., STICE, L. **Bovine embryo development after lyophilized sperm injection.** Therio., v.55, p.505, 2001 (abstr).

KESKINTEPE, L., MORTON, P.C., SMITH, S.E. TUCKER, M.J., SIMPLICIO, A.A., BRACKETT, B.G. **Caprine blastocyst formation following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and defined culture.** Zygote, v.5, p.261-5, 1997.

KESKINTEPE, L., MORTON, P.C., SMITH, S.EE., TUCKER, M.J., SIMPLICIO, A.A., BRACKETT, B.G. **Caprine blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection (ICSI).** Therio., v.47, p.249, 1999.

KEEFER CL, YOUNIS AI, BRACKETT BG. **Cleavage and development of bovine oocytes fertilized by sperm injection.** Mol Reprod Dev., v. 25, p. 281-285, 1990.

KEEFER, C.L. **Fertilization by sperm injection in the rabbit.** Gamete Res., v.22, p.59-69, 1989.

KIM NH, SHIN JS, KIM C, JUN SH, LEE HT, CHUNG KS. **Fertilization and *in vitro* development of porcine oocytes following intracytoplasmic injection of round spermatid or round spermatid nuclei.** Therio., v. 51, p. 1441-1449, 1999.

KING WA, XU KP, SIRARD MA, GREVE T, LECLERC P, LAMBERT RD, JACQUES P. **Cytogenetic study of parthenogenetically activated bovine oocytes matured *in vivo* and *in vitro*.** Gam Res., v. 220, p. 265-274, 1988.

KIMURA, Y., YANAGIMACHI, R. **Intracytoplasmic sperm injection in mice: increased fertilization and development to term after induction of the acrosome reaction.** Hum. Reprod., v.10, p.709-20, 1995.

LIU BH, WANG FH. (1997) **Parthenogenetic activation of mouse oocytes by 6-dimethylaminopurine.** Therio.,v. 47,p. 208-208, 1997.

LUNDIN K, SJOGREN A, NILSSON L, HAMBERGER L. **Fertilization and pregnancy after intracytoplasmatic microinjection of acrosomeless spermatozoa.** Fertil Steril., v.62, p. 1266-1267, 1994.

MAHI, C.A., YANAGIMACHI, R. **Induction of nuclear decondensation of mammalian spermatozoa in vitro.** J.Reprod. Fertil., v.44, p.293-96, 1975.

MARTINS CF, SILVA AEDF, RUMPF R. **Injeção intracitoplasmática de células espermáticas e suas aplicações na reprodução dos bovinos.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. (Embrapa Cenargen. Documentos, n.84).

MARTINS, C.F., SILVA, A.E.D.F., MATARAZZO, R. RUMPF, R. **Evaluation of the quality of cryopreserved bovine epididymal spermatozoa by analysis of motility, acrosomal status , penetration ability in oocytes and integrity of sperm chromatin.** Biol. Reprod., v.62, p.156, 2000.

MARTINS, C.F., FELICIANO SILVA, A.E.D., RUMPF, R., UNANIAN, M.M., MATTOS, L.M. **Utilização da técnica de injeção intracitoplasmática para avaliação do potencial de fecundação de espermatozoides do ejaculado e epidídimo bovino.** In: 38º REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, p.454-55, 2001.

MATOS, LUIS FONSECA. D. S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; fevereiro de 2004; **Produção *in vitro* de embriões bovinos por meio da Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide (ICSI).**

MEDVEDEV S, BOSSAK N, ECKERT J, LUCAS-HAHN A, NIEMANN H, JOHNSON LA. **Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with flow cytometric sorted Ychromosome bearing bovine sperm.** Therio.,v. 47, p. 270, 1997 (abstr.).

MERTON JS, HARING, RM, STAP J, HOEBE RA, ATEN JA. **Effect of flow cytometrically sorted frozen thawed semen on success rate of *in vitro* bovine embryo production.** Therio., v. 47, p. 295, 1997 (abstr.).

MINAMIHASHI, A.,WATSON, A.J., WATSON, P.H., CHURCH, R.B., SCHULTZ, G.A. **Bovine parthenogenetic blastocysts following in vitro maturation and oocyte activation with ethanol.** Therio., v.40, p.63-76, 1993.

MIYAMURA M, YOSHIDA M, HAMANO S, KUWAYAMA M. **Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes,** Therio., v. 43, p. 282-282, 1995.

NAGAI T. **Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes *in vitro* with ethanol.** Gam Res., v. 16, p. 245-249, 1987.

OCK SA, BHAK JS, BALASUBRAMANIAN S, LEE HJ, CHOE SY, RHO GJ. **Different activation treatments for successful development of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection.** Zygote., v.11, p. 69-76, 2003.

OGURA, A., YANAGIMACHI, R. **Round spermatid nuclei injected into hamster oocytes form pronuclei and participate in syngamy.** Biol. Reprod., v.48, p. 219-25, 1993.

OHLWEILER et al., **Intracytoplasmic sperm injection improves in vitro embryo production from poor quality bovine oocytes.** Theriogenology 79 (2013) 778-783.

OIKAWA T, HORIUCHI T, KIKUCHI T, TAKADA N, EMUTA C, NUMABE T. **Bovine embryo production by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and repeated ovum pick-up (OPU) techniques.** Therio., v. 55, p. 507, 2001(abstr.).

PALERMO G, JORIS H, DERDE MP, et al. **Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte.** Lancet., v. 340(1) p.17–18, 1992.

PALERMO, G., et al. **Aggressive sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection with immature spermatozoa improves fertilization and pregnancy rates.** Hum Reprod, v. 11, p 1023-1029, 1996.

PAYNE, D. **Intracytoplasmic sperm injection: instrumentation and injection technique.** Reprod. Fertil. Dev., v.7, p.185-96, 1995.

PARRISH JJ, SUSKO-PARRISH JL, LEIBFRIED-RUTLEDGE ML, CRITSER ES, EYESTONE WH, FIRST NL. **Bovine *in vitro* fertilization with frozen thawed semem.** Therio., v. 25, p. 591-600, 1986.

PARRINGTON J, SWANN K, SHEVCHENKO V, SESAY A, LAI FA. **Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein.** Nature., v. 379, p. 364-368, 1996.

PERREAULT, S.D., BARBEE, R.R., ELSTEIN, K.H., ZUCKER, R.M., KEEFER,

C.L. **Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo by sperm microinjection and in vitro by flow cytometry.** Biol. Reprod.,v.39, p.157-167, 1988.

PERREAULT, S.D. **Regulation of sperm nuclear reactivation during fertilization.**In Bavister, B.D., Cummins, J. and Roldan, E.R.S. (eds), fertilization in mammals. Sereno Symposia USA, Norwell, MA, p.285-296, 1990.

PERRY, A.C.F., WAKAYAMA, T., KISHIKAWA, H., KASAI, T., TOYODA, Y.YANAGIMAGHI, R. **Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection.** Science, v.284, p.1180-83, 1999.

PARRISH JJ, SUSKO-PARRISH JL, LEIBFRIED-RUTLEDGE ML, CRITSER ES, EYESTONE WH,FIRST NL. (1986) **Bovine *in vitro* fertilization with frozen thawed semem.**Theriogenology, 25: 591-600.

PRESICCE GA, YANG X. (1994) **Parthenogenetic development of bovine oocytes matured *in vitro* for 24 hrs and activated by ethanol and cycloheximide.** Mol Reprod Dev, 38: 380-385.

PROCHAZKA R, DURNFORD R, FISER PS, MARAIS GJ. (1993) **Parthenogenetic development of activated *in vitro* matured bovine oocytes.** Theriogenology, 39:1025-1032.

QIAN X.Q., INAGAKI, H., SASADA, H., SUGAWARA, S. **Decondensation of male pronuclear formation in bovine oocytes after microinjection of bovine sperm pretreated with disulfide bond reducing agents.** J. Mammal Ova Res., v.13,p.118-121, 1996.

RENS W, WELCH GR, JOHNSON LA. **A novel nozzle for more efficient sperm orientation to improve sorting efficiency of X and Y chromosome-bearing sperm.** Cytometry,v. 33, p. 476-481, 1998.

Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.35, n.2, p.124-129, abr./jun. 2011.
Disponível em www.cbpa.org.br, pesquisa realizada em 10/03/2014.

RYBOUCHKIN A, DOZORTSEV D, DE SUTTER P, QIAN C, DHONT M. **Intracytoplasmic injection of human spermatozoa into mouse oocytes: a useful model to investigate the oocyte-activating capacity and the karyotype of human spermatozoa.** Hum Reprod, v.10, p. 1130-1135, 1995.

RHO GJ, KAWARSKY S, JOHNSON WH, KOCHHAR K, BETTERIDGE KJ. **Sperm and oocyte treatments to improve the formation of male and female pronuclei and subsequent development following intracytoplasmic sperm injection into bovine oocytes.** Biol Rep, v.59, p. 918-924, 1998.

SELIGMAN, J. SHALGI, R., OSCHRY, Y., KOSOWER, N.S. **Sperm analysis by flow cytometry using the fluorescent thiol labeling agent monobromobimane.** Mol. Reprod. Dev., v.29, p.276-281, 1991.

SEIDEL JUNIOR GE, SCHENK JL, HERICKHOFF LA, DOYLE SP, BRINK Z, GREEN RD, CRAN DO. **Insemination of heifers with sexed sperm.** Therio, v. 52, p. 1407-1420, 1999.

SILBER, S.J., VAN STEIRTEGHEM, A.C., LIU, J., NAGY, Z., TOURNAYE, H., DEVROEY, P. **High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection:with spermatozoa obtained from testicle biopsy.** Hum. Reprod.,v.10,148-52, 1995.

SIRARD MA, FLORMAN H, BARNES F, FIRST NL. ***In vitro* maturation of bovine oocytes: Nuclear changes and protein requirement.** Therio., v.29, p. 307, 1988.

SOFIKITIS, N. V.,MIYAGAWA, I., AGAPITOS, E., PASIYANOS, P., TODA, T., HELLSTROM, W.J.G., KAWAMURA, H. **Reproductive capacity of the nucleus**

of the male gamete after completion of meiosis. J. Assist. Reprod. Genet., v.11,p.335-41, 1994.

SOLOY E, KANKA J, VIUFF D, SMITH SD, CALLESEN H, GREVE T. **Time course of pronuclear DNA synthesis in parthenogenetically activated bovine oocytes.** Biol Reprod.,v. 57, p.27–35, 1997.

SUSKO-PARRISH, JL, LEIBFRIED-RUTLEDGE ML, NORTHEY DL, SCHUTZKUS V, FIRST NL.**Inhibition of protein kinase after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic Completion.** Dev Biol, v. 1166, p. 729-739, 1994.

SUTOVSKY P, SCHATTEN G. **Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization.** Biol Reprod, v. 56, p. 1503-1512, 1997.

SUTTER, R., ZAKHARTCHENKO, V., STOJKOVIC, P., MULLER, S., ALBERIO,R., MEDJUGORAC, I., BREM, G., WOLF, E. AND STOJKOVIC, M. **Intracitoplasmic sperm injection in bovine: effects of oocyte activation, sperm pretreatment and injection technique.** Therio., v.54, p.935-48, 2000.

SZCYGIEL MA, WARD WS. **Combination of dithiothreitol and detergent treatment of spermatozoa causes paternal chromosomal damage.** Biol Reprod, v.67, p. 1532-1537, 2002.

SZCZYGIEL MA, MOISYADI S, WARD WS. **Expression of foreign DNA is associated with paternal chromosome degradation in intracytoplasmic sperm injection- mediated transgenesis in the mouse.** Biol Reprod., v. 68, p. 1903-10, 2002.

STEIRTEGHEM, A. **Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection** *Fertil. Steril.*, v. 59, p. 826-35, 1993.

SWANN K., OZIL . **Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation.** *Int Rev Cytol.*, v.152, p. 183-222, 1994.

TESARIK, J., SOUSA, M., TESTART, J. **Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection.** *Hum. Reprod.*, v.9, p.511-18, 1994.

TOCHARUS, C., KITIYANANT, Y., PAVASUTHIPASIT, K. **Fertilization and subsequent development of bovine embryos after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using different injection pipettes.** *Therio.*, v.45, p.302, 1996 (abstr).

UEHARA, T., YANAGIMACHI, R. **Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei.** *Biol. Reprod.*, v.15, p.457-70, 1976.

VAN STEIRTEGHEM, A.C., LIU, J., JORIS, H., NAGY, Z., JANSSENSWILLEN, C., TOURNAYE, H., DERDE, M. P., VAN ASSCHE, E., DEVROEY, P. **Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of second series of 300 consecutive treatment cycles.** *Hum. Reprod.*, v. 8, p. 1055-60, 1993 .

VANDEN MEERSCHAUT, F ET AL. **Assisted oocyte activation following ICSI fertilization failure.** *Reproductive Bio-Medicine Online* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.01.008>)

VAJTA, G. & KUWAYAMA, M. **Improving Cryopreservation Systems.** *Theriogenology*. Vol. 65, p. 236-244, 2006.

WALL RJ, PURSEL VG, HAMMER RE, BRINSTER RL. (1985) **Development of porcine ova that were centrifuged to permit visualization of pronuclei.** Biol Reprod, 32: 645- 651.

WANG E, TAYLOR RW, PFEIFFER DR. (1998) **Mechanism and specificity of lanthanide series cation transport by ionophores A23187, 4-BrA23187, and Ionomycin.** Biophys J, 75: 1244-1254.

WERE, C., BARNES, F., MAIKI-LAURIA, M., FIRST, N.L. **Age dependence of bovine oocyte activation.** Gamete Res., v.22, p.265-75, 1989.

WESTHUSIN ME, ANDERSON JG, HARMS PG, KRAEMER DC. **Microinjection of spermatozoa into bovine eggs.** Therio, v.21, p. 274, 1984.

WINGER QA, DE LA FUENTE R, KING WA, ARMSTRONG DT, WATSON AJ. **Bovine partenogenesis is characterized by abnormal chromosomal complements: implications for maternal and paternal co-dependence during early bovine development.** Dev Genetics, v. 21, p.160-166, 1997.

YANAGIDA K, KATAYOSE H, HOSHI K. **Effect of electrical stimulation on oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection.** JMamm Ova Res 1997; 14(2): 132–138

YANAGIDA K, KATAYOSE H, YAZAWA H, KIMURA Y, SATO A, YANAGIMACHI H, et al. **Successful fertilization and pregnancy following ICSI and electrical oocyte activation.** Hum Reprod ., v. 14, p.1307–11, 1999.

YANAGIMACHI R. **Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity.** Zygote ., v. 2(4), p. 371–372, 1994.

YANG X, PRESICCE GA, MORAGHAN L, JIANG S, FOOTE RH. (1994) **Synergistic effect of ethanol and cycloheximid on activation of freshly matured bovine oocytes.** Theriogenology 41: 395-403.

ZIMMERMANN U, VIENKEN J. (1982) **Electric field-induced cell-to-cell fusion.**
J Membr Biol. 67: 165-82.

4 RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO

4.1 Introdução

O estágio supervisionado é uma disciplina exigida no 10º semestre do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB), para a obtenção do grau de bacharel em Medicina Veterinária.

O estágio curricular foi realizado no período de 26 de Março à 30 de Maio de 2014 com carga horária de 40 horas semanais, totalizando 480 horas na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN, sob a supervisão e orientação da pesquisadora Dra. Margot Alves Nunes Dode e do professor Dr. Ivo Pivato.

Durante o período de 3 meses foram acompanhadas as atividades no Laboratório de Reprodução Animal (LRA 1) prédio da biotecnologia (PBI) localizado no CENARGEN.(Parque Estação Ecológica – PqEB- Av W5 Norte., e também as atividades realizadas no Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem (CES) (LRA II). Estrada Taguatinga/Núcleo Bandeirante, Brasília, DF.

4.2 Atividades Desenvolvidas

- Acompanhamento das atividades de lavagem; esterilização e preparação de meios de cultivo;
- Acompanhamento da atividade de aspiração e dissecação de folículos;
- Acompanhamento da atividade de Produção *in vitro* de Embriões (PIV).
- Acompanhamento das atividades de rotina do LRA nos laboratórios do PBI;
- Acompanhamento das atividades de rotina e experimentais da fazenda Sucupira;
- Acompanhamento das atividades de avaliação de sêmen;
- Participação no Journal Club

4.2.1 Rotina no LRA I

Durante o estágio no LRA I a rotina consistiu de acompanhar projetos relacionados à retenção de maturação de ovócitos utilizando diferentes concentrações de Cilostamida, produção *in vitro* de embriões, maturação de ovócitos, avaliação morfológica de espermatozoides bovinos, criopreservação de espermatozoides, entre outros como exemplificado no Quadro 1. Dentre as várias atividades acompanhadas a mais corriqueira foi a aspiração folicular juntamente com a fertilização *in vitro* (FIV).

Abaixo segue duas tabelas com um resumo das atividades desenvolvidas durante o estágio.

Tabela 2. Rotina de atividades acompanhadas/desenvolvidas no LRA I e quantidades de vezes observadas e/ou realizadas.

Atividades Desenvolvidas/ Acompanhadas	Número
Lavagem e esterilização de materiais	*
Produção de pipetas para manipulação de oócitos e embriões	100
Aspiração folicular de ovários de abatedouros	200
Dissecação de folículos maiores que 3 mm	10
Produção <i>in vitro</i> de embriões	15
Preparo de meios	5
Limpeza do banho-maria	7
Limpeza de estufa	2
Avaliação da morfologia espermática	10

Fixação e coloração de oócitos	50
Participação no “Journal Club”	12
Acompanhamento da Clonagem	1
Acompanhamento da fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	20

* Realizada diariamente

4.2.2 Rotina da Fazenda Sucupira –LRA II

Na fazenda Sucupira, a rotina das atividades acompanhadas compreendeu o uso da ultrassonografia para avaliação de dinâmica folicular em bezerras, sincronização de vacas, avaliação de involução uterina em vacas paridas, coleta de embrião de porcas, palpação retal, técnica de *Ovum pick up* (OPU), videolaparoscopia para aspiração folicular em bezerras entre outras.

Tabela 3. Atividades desenvolvidas/acompanhadas no LRAII (Fazenda Sucupira) e quantidade de vezes realizadas e/ou observadas.

Atividades Desenvolvidas/ Acompanhadas	Número
Acompanhamento da Aspiração Folicular guiado por Ultrassonografia (OPU) em bovinos	10
Palpação retal	25
Vermifugação de ovinos	20
Coleta de sangue em bovinos	10
Criopreservação de sêmen	5

Protocolo de IATF	20
Ultrassonografia	40
Acompanhamento de Transferência de Embriões	10
Acompanhamento Aspiração Folicular <i>in vivo</i> (videolaparoscopia)	1
Coleta de sêmen ovino	10
Acompanhamento de Coleta de Embriões de Porcas (laparoscopia)	10

4.2.3 Aspiração folicular

Os ovários usados na rotina do laboratório de reprodução animal (LRA I e II) são obtidos em abatedouros da região. Depois de colhidos no abatedouro são transportados em caixa térmica em solução salina 0,9% suplementada com antibióticos e aquecida a 35°C. Ao chegar ao laboratório os ovários são lavados com solução salina aquecida a 35°C para retirar o excesso de sangue e facilitar a aspiração e/ou dissecação e são mantidos no banho-maria enquanto ocorre o processo de aspiração. O processo de aspiração dos oócitos inicialmente era feito com bomba a vácuo e depois foi substituído por seringa com agulha 40x12, verificando uma maior taxa de recuperação de oócitos.

Antes de começar o processo de aspiração é ideal que o fluxo laminar e o banho-maria sejam ligados com pelo menos 2 horas de antecedência, assim como deve ser feita a limpeza de todo o local com álcool 70%. Ademais devem ser colocados tubos de 15 ml no banho-maria e a verificação dos equipamentos de aspiração.

Após a punção o ideal é aguardar 10 minutos para que os oócitos sedimentem no fundo do tubo. O pellet deve ser retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e colocado em uma placa de petri, contendo meio de

lavagem (TCM-HEPES) com 10% de Soro Fetal Bovino. Os oócitos são rastreados e os encontrados são colocados em outra placa de petri, contendo 2-3 mL de meio de lavagem. Os oócitos são selecionados quanto à qualidade, avaliando uniformidade do citoplasma e quantidade e aparência das células do *cumulus*.

Tanto os oócitos oriundos de aspiração folicular quanto os oriundos de dissecação podem ser rastreados e selecionados no meio (LAV – TCM-Hepes com 10% de soro fetal bovino) ou líquido folicular centrifugado.

Para que a viabilidade dos oócitos não seja afetada drasticamente é necessário todo o processo desde a colheita dos ovários no abatedouro até a maturação não ultrapasse o tempo de 4-6 horas.

4.2.4 Produção *in vitro* de embriões

O processo de produção *in vitro* de embriões se divide em três etapas: maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV), e cultivo *in vitro* de embriões.

Antes de iniciar o procedimento os meios devem ser estabilizados com no mínimo 2 horas de antecedência.

4.2.4.1 Maturação *in vitro*

A classificação dos oócitos ocorre de acordo com a quantidade de camadas de células do *cumulus* e a qualidade morfológica intracelular.

Grau 1: *cumulus* compacto contendo mais de três camadas de células e citoplasma do oócito apresenta homogêneo.

Grau 2: *cumulus* compacto, parcialmente presente ao redor do oócito, com menos de três camadas celulares. O citoplasma possui granulações distribuídas de modo heterogêneo.

Grau 3: *cumulus* presente, porém expandido. O citoplasma apresenta-se contraído, degenerado, fragmentado ou com presença de vacúolos.

Grau 4: oócitos desnudos, células do *cumulus* ausentes, porém o citoplasma apresenta granulações homogêneas.

Atrésicos: citoplasma com granulações irregulares e células do *cumulus* enegrecidas.

Os oócitos de grau I e II são selecionados e colocados para maturar em gotas com 150 a 200 μ l de meio de maturação, cada gota com 25 a 30 oócitos cobertos por óleo mineral. A placa de maturação deve ser estabilizada previamente para evitar alterações de pH. O processo de maturação ocorre em um período de 22-24 horas a temperatura de 38°C com atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

4.2.4.2 Fecundação *in vitro* (FIV)

A FIV é realizada com oócito maduro, ou seja, que esteja na metáfase II da meiose e, além disso, também precisa de um espermatozoide capacitado. Por isso após o processo de maturação os ovócitos são lavados em meio de fecundação–FEC e transferidos para as gotas de FIV previamente estabilizada.

O FEC é adicionado de penicilamina, hipotaurina que têm por função agir como antioxidante, estimular a motilidade espermática e ser uma fonte proteica, garantindo efeitos favoráveis aos resultados (GORDON e LU, 1990). E também, por heparina que auxilia na capacitação dos espermatozoides pela remoção de componentes do plasma seminal da superfície espermática (HAFEZ e HAFEZ, 2003).

A preparação do sêmen envolve o descongelamento da palheta de sêmen em água a 37°C por 30 ou 60 segundos dependendo do volume da palheta de sêmen e a posterior aplicação dos gradientes de percoll 45/90% para retirada dos espermatozoides mortos. O sêmen é colocado sobre a coluna de percoll e centrifugado a 9000rpm/5minuto. Após, retirar o pelet e ressuspender em 1 ml de meio CAP; centrifugar a 9000rpm/5min; retirar o sobrenadante; acrescentar em torno de 100 μ l de FEC FINAL.

Em um micro-tubo tipo Eppendorff colocar 95 ml de água e acrescentar 5 ml do sêmen ressuspendido em meio FEC Final (1:20) para contagem da concentração espermática em câmara de Neubauer.

Antes de centrifugar também se avalia motilidade e vigor do sêmen para acrescentar na dose inseminante à quantidade que falta para completar 100% de SPTZ vivos com movimentos progressivos. Com a dose inseminante calculada (1 milhão/mL GORDON e LU, 1990), o sêmen é adicionado às gotas de FEC com os oócitos maduros. Serão incubados no meio de fecundação por um período de 12 a 18 horas, em estufa à 38°C, com 5% de CO₂.

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

Ao mesmo tempo em que há a fusão das membranas das células masculina e feminina, o cálcio citosólico aumenta, ativando o oócito, para continuação da meiose e liberação do corpúsculo polar; também liberando o conteúdo dos grânulos corticais por exocitose, incluindo enzimas capazes de hidrolisar parcialmente a zona pelúcida, tornando endurecido o envoltório extracelular do oócito.

4.2.4.3 Cultivo *in vitro* (CIV)

Para proceder ao cultivo *in vitro* é necessário deixar o meio SOF estabilizando na estufa 2 horas antes ou overnight.

Após 18 horas de co-cultivo oócitos e SPTZ, os prováveis zigotos são retirados do meio FIV, levemente pipetados e lavados em 02 ou 03 gotas do meio SOF, para retirada de espermatozoides e transferidos para a gota de cultivo embrionário. As células do *cumulus* remanescentes não são retiradas. Em D2, 48 horas pós-inseminação, os zigotos são avaliados quanto à clivagem, após isso, será avaliada a taxa de blastocistos (blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e

blastocisto eclodido) em D6, D7 e D8. Por fim, os embriões podem ser transferidos para o útero de uma receptora, ou criopreservados.

4.2.5 Vitrificação de Embriões

A vitrificação de embriões é uma opção vantajosa para a criopreservação de embriões de mamíferos, por ser um método rápido e não causar a formação de cristais de gelo durante o congelamento. É considerada um método de eleição para congelamento de embriões e gametas de várias espécies (VAJTA e KUWAYAMA, 2006; SMITH et al., 2010).

O método de vitrificação acompanhado durante o estágio foi o Cryoptop. Por meio desse método foram vitrificados oócitos aspirados de ovários vindos de abatedouros e embriões de porca coletados na fazenda Sucupira.

4.2.6 Palpação Retal

A palpação retal consiste em um dos procedimentos mais utilizadas para o diagnóstico de gestação em bovinos. Além disso, essa técnica também permite identificar a fase de gestação e possíveis problemas reprodutivos.

De acordo com o estágio reprodutivo podem ser feito os seguintes procedimentos durante a palpação retal:

- 32 dias: realização do beliscamento, observando a presença de parede dupla;
- 45 dias: observação de assimetria entre os cornos devido a presença de pequena bolsa;
- Útero em forma de uma grande bolsa mais ainda pode ser contornado em toda sua extensão;
- 120 dias: Útero distendido e tenso. Não pode ser contornado em toda sua extensão;

- 6 meses: feto atinge a cavidade abdominal;
- 7 meses: Feto já se encontra na cavidade abdominal e já é possível a palpação de partes do feto.

4.2.7 *Journal Club*

O *Journal Club* é uma reunião semanal na qual os alunos de mestrado e doutorado apresentam um artigo científico relacionado com o tema sobre o qual desenvolvem estudos. Durante o meu estágio final tive a oportunidade de participar de 12 encontros e consequentemente desenvolver uma visão mais aprofundada dos experimentos em desenvolvimento no laboratório de reprodução animal.

4.2.8 Ultrassonografia

A ultrassonografia consiste em uma das principais técnicas para avaliação do estado reprodutivo das fêmeas bovinas. Além disso, é um método muito útil para seleção de fêmeas receptoras de embriões. Utilizou-se a ultrassonografia com doppler para observar o tamanho dos folículos, presença ou não de corpos lúteos, tamanho dos cornos, presença de conteúdo dentro dos cornos, etc.

4.2.9 Transferência de Embriões

A transferência de embriões é uma técnica que tem como objetivo a multiplicação de progênie de fêmeas de alto valor genético. Os embriões são obtidos de fêmeas de alto valor e em seguida transferidos para fêmeas receptoras.

Antes da realização da inovulação do embrião é necessária a avaliação da receptora quanto a presença de corpo lúteo no ovário por meio da utilização de ultrassonografia.

Para a realização da técnica, é necessário a anestesia epidural com o anestésico lidocaína, inovulador devidamente montado com o

embrião em seu interior. Depois procede-se a inovulação do embrião no corno uterino correspondente ao ovário que apresenta o corpo lúteo.

4.2.10 Conclusão

O estágio realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa, uma central de pesquisa renomada na área de reprodução, me ofereceu a oportunidade de vivenciar e aprender um pouco da realidade de um centro de pesquisas, seus desafios e recompensas. Proporcionando-me a possibilidade de ser uma profissional capacitada e preparada ao finalizar o curso de medicina veterinária.