



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

ALINE BRITO MEDEIROS

Liofilização celular e sua aplicação na Reprodução Animal

Brasília, DF

Julho de 2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

ALINE BRITO MEDEIROS

Liofilização celular e sua aplicação na Reprodução Animal

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

Orientador: Prof. Dr. Ivo Pivato

Brasília, DF

Julho de 2014

Ficha Catalográfica

Medeiros, Aline Brito.

Liofilização celular e sua aplicação na reprodução animal/ Aline Brito Medeiros; orientação de Ivo Pivato. – Brasília, 2014

55 p.: il.

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

1. Bovino 2. Criopreservação 3. Criodesidratação. 4. Genética. 4. Reprodução animal. 4. Sperm freeze-drying.

I. MEDEIROS, A.L. II. Liofilização celular e sua aplicação na reprodução animal.

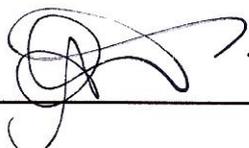
Cessão de Direitos

Nome do Autor: Aline Brito Medeiros.

Título da Monografia de Conclusão de Curso: Liofilização celular e sua aplicação na reprodução animal.

Ano: 2014

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. A autora reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.



Aline Brito Medeiros

e-mail: alinebritomedeiros@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: MEDEIROS, Aline Brito.

Título: Liofilização celular e sua aplicação na reprodução animal.

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

Aprovado em: 01/07/2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ivo Pivato

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: APROVADA

Assinatura: 

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: Aprovada

Assinatura: 

MSc. Eleonora Araújo Barbosa

Instituição: Embrapa

Julgamento: Aprovado

Assinatura: Eleonora Araújo Barbosa

Dedicatória

*À minha mãe, por ser aquela a
sempre acreditar, incentivar,
aconselhar, e por ter tomado
tudo isso possível.*

Agradecimentos

À minha mãe por todo o seu esforço, dedicação, paciência, amor, e principalmente por ter sempre acreditado em mim e nos meus sonhos, até mesmo quando eu duvidava. Ao meu irmão e a toda minha família, que mesmo de longe nunca deixaram de me incentivar.

Ao meu orientador, prof. Dr. Ivo Pivato, pela oportunidade e confiança a mim dada, por todo o seu carinho, paciência e por todo o apoio dado durante essa jornada. Sempre será um prazer poder aprender contigo.

Ao meu supervisor de estágio, Dr. Ricardo A. Figueiredo, pela acolhida e por seu apoio durante esta etapa essencial da minha graduação.

Aos pesquisadores Dr. Alexandre, Dra. Bianca e Dra. Margot, pela orientação, e pela paciência em todas as minhas perguntas durante todo o transcorrer do meu estágio.

Aos amigos estagiários, mestrandos, doutorandos da Embrapa Cenargen e Fazenda Sucupira, Aerton, Ana Luiza, Andrielle, Anelise, Catherine, Chico, Eleonora, Felipe, João, José Carvalho, Juliane, Ligiane, Luzia, Marianna, Mateus, Nayara, Nathalia, Netto, Oscar, Rafaelli, Renato, Thaís, Thiago, por todos os ensinamentos e pelas ótimas experiências vivenciadas durante este período. Pois com toda a certeza fizeram muita diferença em meu estágio.

A todos os funcionários da fazenda Sucupira e da Embrapa Cenargen pelo auxílio cotidiano e por possibilitar a realização de diversas atividades durante esse curto período.

Aos meus amigos de graduação, Adriana, Camille, Gabriel, Gabriela, Geórgia, Fernando, Keyfanne, Letícia, Nádia, Rafaelli, Thiago, por todos os momentos especiais e até mesmo aqueles mais difíceis. Por todos os desesperos pré-prova compartilhados, por todos os choros e risadas. Por serem os melhores. E sem me esquecer de agradecer as minhas mais que especiais “Bififis”, muito obrigada por tudo.

À Universidade de Brasília e a todos os professores de graduação, pelos conhecimentos compartilhados, em especial àqueles que foram meus orientadores durante a graduação. É com muito orgulho que digo que esta foi uma das etapas mais importantes da minha vida.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo suporte na realização do meu estágio final.

A todos os quais eu deixei de citar, mas que de alguma forma fizeram parte dessa caminhada. Muito obrigada.

Epígrafe

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.” *Martin Luther King.*

MEDEIROS, A. B. **Liofilização celular e sua aplicação na reprodução animal**. [Lyophilization and its application in animal reproduction]. 2014. 55p. Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Resumo

A liofilização, ou criodesidratação, trata-se de um método alternativo de preservação celular. Esta prática é utilizada para conservar ou tornar prático o uso de diversos materiais biológicos, como produtos farmacêuticos, alimentos, e também tem sido proposta como método alternativo para conservação de espermatozoides. A liofilização pode auxiliar a preservação de células espermáticas, facilitando o armazenamento e transporte nacional ou internacional, dispensando o uso de nitrogênio líquido para armazenamento. A liofilização pode manter espermatozoides viáveis por vários anos quando armazenados a 4°C, e por horas quando em temperatura ambiente. Além disso, pode também reduzir os riscos de contaminação, isso por não serem necessários todos aqueles cuidados com o botijão, o que com certeza promoverá uma expansão nas trocas de importantes linhagens genéticas mundialmente. Porém, até o momento, a liofilização gera espermatozoides sem ou com reduzida motilidade, por esse motivo depende de outra biotécnica para resultar em desenvolvimento embrionário, a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), que é uma técnica não comercial em bovinos, ainda apresenta falhas na ativação de ovócitos bovinos, prejudicando as taxas de desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: animal, bovino, criopreservação, espermatozoides, reprodução, veterinária.

MEDEIROS, A. B. **Lyophilization and its application in animal reproduction.** [Liofilização celular e sua aplicação na reprodução animal]. 2014. 55p. Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Abstract

Lyophilization or freeze-drying is an alternative method of cellular preservation. This practice is used to store or render practical the use of various biological materials, such as pharmaceuticals, food, and their use in sperm has also been proposed. Lyophilization can be very useful as preservation of sperm cells by facilitating national or international transport, eliminating the use of liquid nitrogen for storage. Lyophilization can maintain the sperm viable for many years when stored at 4°C, and for hours when at room temperature. Moreover, it can also reduce the risks of contamination, for not being necessary all those cautions with the holding tanks, which certainly will promote an expansion in trade of major genetic lineages worldwide. However, to date, lyophilization process generates sperm without or with reduced motility, and because of that, depends on another biotechnology to result in embryonic development, the intracytoplasmic sperm injection (ICSI), which is a non-commercial biotechnology and still has flaws in activation oocytes, affecting the rates of embryonic development.

Keywords: animal, bovine, cryopreservation, freeze-drying, reproduction, sperm.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. CRIOPRESERVAÇÃO CONVENCIONAL.....	16
2.2. LIOFILIZAÇÃO.....	17
2.3. HISTÓRICO DA LIOFILIZAÇÃO.....	18
2.3.1. <i>Liofilização: diversos produtos.....</i>	<i>18</i>
2.3.2. <i>Liofilização de células espermáticas.....</i>	<i>19</i>
2.3.3. <i>Liofilização de células espermáticas bovinas.....</i>	<i>21</i>
2.4. INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES.....	23
2.4.1. <i>Técnica Piezo-ICSI.....</i>	<i>24</i>
2.5. PRINCÍPIOS DO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO.....	24
2.5.1. <i>Congelamento.....</i>	<i>25</i>
2.5.2. <i>Desidratação Primária.....</i>	<i>25</i>
2.5.3. <i>Desidratação Secundária.....</i>	<i>26</i>
2.6. ESTRUTURA ESPERMÁTICA.....	27
2.7. DANOS DECORRENTES DA CRIOPRESERVAÇÃO.....	27
2.8. FUNÇÃO E INTEGRIDADE DOS ESPERMATOZOIDES APÓS A LIOFILIZAÇÃO.....	28
2.9. MEIOS PROTETORES NO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO.....	28
2.9.1. <i>Substâncias núcleo-protetoras.....</i>	<i>29</i>
2.10. PROTOCOLO DE LIOFILIZAÇÃO ESPERMÁTICA.....	29
2.10.1. <i>Avaliação da amostra de sêmen bovino.....</i>	<i>30</i>
2.10.2. <i>Centrifugação da amostra.....</i>	<i>31</i>
2.10.3. <i>Adição da solução tampão de EGTA (ou derivado).....</i>	<i>31</i>
2.10.4. <i>Liofilização.....</i>	<i>31</i>
2.10.5. <i>Reidratação e ICSI.....</i>	<i>32</i>
2.11. PERSPECTIVAS DA LIOFILIZAÇÃO ESPERMÁTICA NA REPRODUÇÃO BOVINA.....	33
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
5. RELATÓRIO DE ESTÁGIO.....	41
5.1. INTRODUÇÃO.....	41
5.2. IDENTIFICAÇÃO DO ESTÁGIO.....	43
5.3. PLANO DE TRABALHO.....	43
5.4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	43
5.4.1. <i>Aspiração de Ovócitos.....</i>	<i>43</i>
5.4.2. <i>Produção in vitro de embriões.....</i>	<i>45</i>
5.4.3. <i>Ultrassonografia.....</i>	<i>47</i>
5.4.4. <i>Transferência de Embriões.....</i>	<i>48</i>
5.4.5. <i>Inseminação Artificial por Tempo Fixo (IATF).....</i>	<i>49</i>
5.4.6. <i>Palpação Retal.....</i>	<i>49</i>
5.4.7. <i>Exame Andrológico.....</i>	<i>50</i>
5.4.8. <i>Coleta e congelamento de sêmen.....</i>	<i>51</i>
5.4.9. <i>“Journal Club”.....</i>	<i>51</i>
5.4.10. <i>Outros.....</i>	<i>52</i>
5.5. CONCLUSÃO.....	55

Lista de figuras

Figura 1: Banho-maria e ferramentas para aspiração folicular.	44
Figura 2: Avaliação PIVE - dia 6	47
Figura 3: Avaliação PIVE - dia 7	47
Figura 4: Avaliação PIVE - dia 8	47
Figura 5: Aparelho de US.....	48
Figura 6: Palpação retal.....	50
Figura 7: Equipamentos para exame andrológico	50
Figura 8: Coleta de sêmen ovino por VA (vagina artificial)	51
Figura 9: Aspiração folicular <i>in vivo</i> (por laparoscopia)	52
Figura 10: Transferência nuclear	53

Lista de Abreviaturas e Siglas

cm - centímetros

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EGTA – Ethyleneglycol-bis (β -aminoethyl ether) –*N,N,N',N'*- tetraacetic acid

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid

FIV – Fertilização *in vitro*

IA – Inseminação artificial

ICSI – Intracytoplasmatic sperm injection (Injeção intracitoplasmática de espermatozoides)

pH – Potencial hidrogenionico

min - minutos

μ g - microgramas

μ l – microlitros

mL - mililitro

mM- milimolar

M – molar

SFB – Soro fetal bovino

TALP – Tyrode's albumen lactate pyruvate

TCM 199 – Tissue culture medium (meio para cultura de tecidos)

TUNEL – Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dudp nick-end labeling

1. INTRODUÇÃO

Diante da atual necessidade de desenvolvimento biotecnológico e científico, a preservação e a manutenção de materiais biológicos vêm ganhando destaque no cenário mundial. Há vários métodos de preservação celular, entretanto, não há um método ideal ou universal que garanta a perfeita conservação das características morfológicas, fisiológicas e genéticas do material biológico. Portanto, é importante primeiramente avaliar o material biológico a ser conservado para realizar a escolha do método de conservação, considerando as vantagens e desvantagens de cada método (SOLA, 2012).

Segundo Costa & Ferreira (1991) apud (SOLA, 2012), os métodos de manutenção de micro-organismos podem ser classificados de acordo com o tempo máximo de preservação: métodos de curto prazo (repique contínuo), métodos de médio prazo (preservação em óleo mineral, preservação em água esterilizada, congelamento a -20°C , e secagem em sílica, solo, papel filtro), e os métodos de longo prazo (liofilização, congelamento a -80°C e criopreservação em nitrogênio líquido).

A partir da descoberta da ação conservativa do frio sobre o metabolismo espermático por Spallazani em 1776, diversos avanços têm sido descritos na tecnologia de conservação do sêmen e sobre o progresso que isto tem na reprodução animal. A importância da preservação dos recursos genéticos é reconhecida mundialmente, sendo a conservação espermática uma contribuição de grande potencial. (YOSHIDA, 2000).

Para conservação de células espermáticas destacam-se a criopreservação e a liofilização, sendo esta última um método alternativo, que não se encontra disponível comercialmente nos dias atuais (SOLA, 2012).

Os atuais métodos para criopreservação de sêmen em especial podem ser definidos como congelamento de equilíbrio (líquido e cristalino), congelamento de não equilíbrio (vítreo), e liofilização (MAZUR, 1990 apud KESKINTEPE et al., 2002). No congelamento de equilíbrio, as células são expostas a soluções crioprotetoras em menores concentrações e resfriadas a intervalos de temperatura entre $0,3^{\circ}\text{C}$ a $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Enquanto que no congelamento de não equilíbrio, as células são expostas a altas concentrações

de crioprotetores e resfriadas em velocidades superiores a 500°C/min (LEIBO & SONGSASEN, 2002).

Apesar do sêmen de muitos mamíferos ter potencial de ser criopreservado por congelamento e usado para produção de prole tanto por via inseminação artificial (IA) ou por fertilização *in vitro* (FIV), a liofilização tem sido proposta como um método alternativo para preservação de sêmen, visto que já é uma técnica amplamente utilizada para conservação de vários materiais: alimentos, medicamentos, vacinas, materiais biológicos, plasma sanguíneo (HOCHI et al., 2011).

O objetivo desta revisão é, portanto, abordar a importância da preservação de materiais biológicos e em especial de espermatozoides, e desenvolver a aplicação da liofilização para estes, debatendo sobre o histórico, o processo físico envolvido, os danos decorrentes do processo, sua aplicação, suas vantagens e por fim, suas limitações.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CRIOPRESERVAÇÃO CONVENCIONAL

O principal objetivo da criopreservação é utilizar temperaturas muito baixas para manter o metabolismo celular em estado de quiescência, e tornar possível o armazenamento de células e tecidos por tempo indeterminado. Um dos princípios mais importantes dessas técnicas é a remoção da maior quantidade de água (desidratação) possível antes de prosseguir com o congelamento. Se o processo de desidratação não for realizado ocorre formação de grandes cristais de gelo que lesam severamente a estrutura intracelular (PEGG, 2002).

Inúmeros estudos a respeito da criopreservação foram realizados, e concluiu-se que algumas substâncias (chamadas crioprotetoras) eram capazes de aumentar a concentração total dos solutos no sistema, sendo possível reduzir a quantidade de cristais de gelo formados, além de evitar as injúrias causadas por efeitos secundários às concentrações do soluto utilizado como o aumento da pressão osmótica e a precipitação irreversível ou a desnaturação dos constituintes coloidais da célula (PEGG, 2002).

Polge et al. (1949) apud (HOCHI et al., 2011), provaram que a inclusão de 10-20% de glicerol permitia que os espermatozoides de galináceos sobrevivessem ao congelamento prolongado à temperatura de -80°C , comprovando, portanto, a importância da utilização de crioprotetores.

Os principais pontos críticos da criopreservação se devem à velocidade de congelamento e à composição da solução onde as células são congeladas. No início do processo, a água extracelular é congelada ao se aproximar do ponto de congelamento, e em decorrência dessa remoção do líquido extracelular vai ocorrendo um desequilíbrio osmótico por aumento da osmolaridade. Quando a velocidade do processo de congelamento é lenta, o equilíbrio permanece constante e a célula fica exposta tanto ao crioprotetor quanto ao estresse osmótico por tempo prolongado, podendo ocorrer lise celular. Por outro lado, quando o processo de congelamento ocorre muito rápido, não há perda de água suficiente, resultando na formação de cristais de

gelo intracelular, e conseqüente lise da célula quando ao descongelamento (MAZUR et al., 2007).

A criopreservação convencional tem obtido considerável sucesso quando associado às tecnologias reprodutivas animais. Trata-se de uma técnica que possibilita um maior e melhor aproveitamento do potencial produtivo e reprodutivo, por proporcionar aumento da disponibilidade de espermatozoides, tornando-se uma importante ferramenta para o melhoramento genético, por permitir a maximização do uso de reprodutores com comprovada superioridade genética (FURST et al., 2005).

2.2. LIOFILIZAÇÃO

Apesar do sucesso da criopreservação, os métodos convencionais dependem do nitrogênio líquido para manter a viabilidade dos gametas, demandando maiores cuidados em relação ao armazenamento e transporte. A liofilização pode ser muito útil em diversos campos de atuação, por facilitar o transporte, nacional ou internacional, por não depender do nitrogênio líquido, o que facilitaria as trocas de importantes linhagens genéticas. E, além destes fatores, algumas outras vantagens incluem: menor custo de armazenamento, possibilidade de conservação de linhagens, espécies, raças raras ou mesmo linhagens transgênicas, e aprofundamento nos estudos de caracterização de espécies-raças por meio de marcadores genéticos, porém que também são encontradas nos métodos de preservação convencionais (MARTINS, 2006).

É por enquanto, um método alternativo para preservação de espermatozoides, mas já vem sendo utilizado industrialmente para preservar materiais biológicos, farmacêuticos e outros (KESKINTEPE et al., 2002). Trata-se, portanto, de uma biotécnica esperada para se tornar o novo método de preservação de sêmen por suas vantagens em relação à criopreservação, sendo a maior delas o fato dos espermatozoides liofilizados poderem ser armazenados a 4°C por anos, e transportados em temperatura ambiente quando por curtos períodos de tempo, sem qualquer necessidade de nitrogênio líquido ou gelo seco (KANEKO & SERIKAWA, 2012). Com isso, o frete desse transporte desse material se tornaria mais fácil e com menor custo (KANEKO et al., 2003).

Entretanto, os estudos com células espermáticas ainda não apresentaram resultados completamente satisfatórios a nível comercial, pois há a necessidade de combinar a liofilização à técnica de Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI) para viabilizar o desenvolvimento embrionário de espermatozoides liofilizados (KESKINTEPE et al., 2002). A ICSI, por sua vez, ainda apresenta baixas taxas de desenvolvimento embrionário na espécie bovina, mesmo quando utilizando espermatozoides não liofilizados. Isto devido a uma falha na ativação dos ovócitos (GÓMEZ, et al., 1998)

2.3. HISTÓRICO DA LIOFILIZAÇÃO

2.3.1. Liofilização: diversos produtos

A liofilização, criodesidratação, ou congelamento a seco, é uma forma alternativa de preservação celular. Pode ser definida como o processo de secagem de uma substância congelada, no qual a maior parte da água é removida por sublimação (MARTINS, 2006).

Historicamente, o primeiro produto liofilizado surgiu em 1911, com o vírus da raiva (TERRONI et al., 2011). Porém só atingiu a escala industrial durante a Segunda Guerra Mundial (1939-1945), devido à demanda por plasma sanguíneo. Entretanto, nesta época já havia a comercialização de café em pó, que surgiu em 1938, pela companhia Nestlé (WARD, 2012).

Devido a grande demanda por sangue durante a Segunda Guerra Mundial, os Estados Unidos da América investiram centenas de milhões de dólares em inúmeras novas possibilidades de desenvolvimento de substitutos do sangue e de plasma sanguíneo, para o tratamento dos soldados feridos nos campos de batalha e que requeriam transfusões de sangue, pois não havia quantidade suficiente de sangue fresco disponível (AYROSA, 2003), sendo que a primeira tentativa da preservação do plasma sanguíneo foi relatada e realizada por Greaves em 1944 (KUMAR et al., 2011).

A aplicação do processo de liofilização focou-se, posteriormente, no campo da indústria farmacêutica, ocorrendo durante a década de 1950 o surgimento de medicamentos liofilizados como antibióticos à base de penicilina

(KUMAR et al., 2011). Paralelo ao surgimento das penicilinas liofilizadas, pesquisas acerca da liofilização de peptídeos, proteínas, anticorpos, enzimas e hormônios foram sendo aprofundadas, e posteriormente comercializadas com fins terapêuticos. A partir disso, surgiram as vacinas liofilizadas, os antibióticos e também as vitaminas (TERRONI et al., 2011).

A partir da década de 1960, passaram a surgir vários alimentos liofilizados no mercado, inclusive alimentos fornecidos aos astronautas em missão no espaço, ganhando grande destaque durante o programa Apollo da NASA. O primeiro alimento liofilizado a ser comercializado foi o Nescafé®, em 1938. Este projeto da Nestlé surgiu em meio à crise que o mercado do café vinha enfrentando, e devido à necessidade de suprir a grande demanda mundial de café da época. O produto Nescafé® foi inicialmente comercializado na Suíça, mas logo expandiu seu mercado para o mundo (ADAMS, 2002). Atualmente, além de café, há muitos produtos liofilizados sendo comercializados, como ervas, frutas, produtos lácteos (MACEDO & MORITZ, 2012).

A revolução da biotecnologia, na década de 1990, levou ao aumento da demanda por produtos liofilizados, bem como de pesquisas mais especializadas no campo da liofilização (KUMAR et al., 2011). E a partir desta época, a técnica foi se expandindo para outros campos de pesquisa, como o da reprodução.

2.3.2. Liofilização de células espermáticas

A ideia de realizar a liofilização em células espermáticas surgiu em meados de 1949, quando foi descrito por Polge et al. apud (HOCHI et al., 2011) que 50% dos espermatozoides de galináceos liofilizados recuperaram sua motilidade após a reidratação, entretanto, a fertilidade nunca fora determinada (LIU et al., 2005). Além de estudos com espermatozoides de galináceos, houve também, tentativas utilizando espermatozoides humanos, descritas por Sherman em 1954 (HOCHI et al., 2011).

Em 1992, Katayose et al. relataram que núcleos de espermatozoides liofilizados de camundongos e humanos retinham sua habilidade de se

desenvolver em pró-núcleo e sintetizar DNA, mesmo quando microinjetados após seis meses de estocagem.

Apesar de alguns relatos de sucesso em relação à motilidade após reidratação de espermatozoides de galináceos, a reprodutibilidade era sempre um tema questionável. Em 1998, foi relatado pela primeira vez a possibilidade de se liofilizar sêmen de camundongo sem perder a capacidade de reprodutibilidade e de desenvolvimento embrionário, e que não havia necessidade de motilidade espermática ou membrana plasmática totalmente íntegra. Isso só foi possível através da combinação da liofilização com a técnica de ICSI em ovócitos maduros. Essa teoria foi comprovada ao microinjetar apenas a cabeça dos espermatozoides de camundongos, resultando em desenvolvimento embrionário (WAKAYAMA & YANAGIMACHI, 1998).

Kusakabe et al. (2001) demonstraram que era possível manter a integridade cromossomal de espermatozoides de camundongo liofilizados com EGTA [Ethyleneglycol-bis (β -aminoethyl ether) –*N,N,N',N'*- tetraacetic acid], mostrando que quase 100% dos ovócitos microinjetados apresentaram cariótipo normal. Comprovou-se, portanto, que o núcleo espermático era tolerante à liofilização, e isto se atribuiu às ligações das pontes de dissulfeto com as protaminas, que são as ligações presentes nos espermatozoides maduros, conhecidas por serem bastante estáveis.

Kaneko et al. (2003) observaram que um outro fator também interferia na integridade cromossomal, o valor do pH da solução de liofilização. Os resultados em relação à integridade cromossomal e à habilidade de desenvolvimento embrionário eram melhores quando os espermatozoides eram liofilizados em meio levemente alcalino (pH entre 8-8.2).

Liu et al. (2004) comprovaram pela primeira vez que era possível preservar a integridade cromossomal de espermatozoides liofilizados também de coelhos, além de viabilizar o desenvolvimento embrionário através da microinjeção (ICSI) e os tratamentos de preservação utilizados. Entretanto, a eficiência média da ICSI utilizando espermatozoide liofilizado foi de apenas 0,4%, o que não significou, necessariamente, que a causa da ineficiência era dos espermatozoides liofilizados, visto que a eficiência da ICSI com

espermatozoides frescos também foi baixa, tendo sido inferior a 4% (LIU et al., 2004).

2.3.3. Liofilização de células espermáticas bovinas

O primeiro estudo relatado acerca do estudo sobre a recuperação da motilidade de espermatozoides de touro após a liofilização, e consequente reidratação, foi descrito por Leidl (1954), o qual resultou na ausência de motilidade dos espermatozoides e na observação de algumas alterações morfológicas, como maior porcentagem de cabeça amorfa, ou separada, que o considerado normal. Este estudo foi de grande importância para os avanços da técnica de liofilização na espécie bovina, pois até o momento, havia apenas relatos de sucesso com sêmen de galináceo (LEIDL, 1954).

Posteriormente surgiram novos relatos de outros grupos de pesquisadores. E em 1959, Meryman & Kafig conseguiram relatar sucesso com a liofilização de espermatozoides bovinos, porém após essa experiência, eles encontraram dificuldades de repetir o feito, fazendo destes, resultados inconstantes. À época, consideraram um provável fenômeno de cristalização para a explicação da falha nas novas tentativas (MERYMAN & KAFIG, 1963).

De acordo com os resultados de pesquisas realizadas entre 1998 e 2004, os antigos resultados em relação à reprodutibilidade foram considerados questionáveis, pois foi concluído que a completa liofilização dos espermatozoides resultava na destruição da membrana plasmática, inviabilizando-os (WAKAYAMA & YANAGIMACHI, 1998).

Goto et al. (1990) apud (MARTINS, 2006), revolucionaram os sistemas de conservação de gametas masculinos ao sugerirem que, não havia necessidade que os espermatozoides estivessem vivos no sentido convencional para resultar em um desenvolvimento embrionário normal. Os avanços nas pesquisas do campo da liofilização espermática bovina estiveram, portanto, estagnados até o surgimento da combinação da técnica de ICSI na utilização do sêmen liofilizado (HOCHI et al., 2011). Comprovou-se que era possível realizar a fecundação com os espermatozoides liofilizados, os quais não possuíam boa motilidade, através dessa biotécnica (KIMURA & YANAGIMACHI, 1995) visto que na ICSI a microinjeção de espermatozoides é

feita diretamente dentro dos ovócitos, viabilizando a fecundação e desenvolvimento embrionário (KESKINTEPE et al., 2002).

Keskintepe et al. (2002) realizaram experimentos combinando a técnica de liofilização com a ICSI, e comprovaram a capacidade de espermatozoides bovinos suportarem o processo de liofilização e gerarem desenvolvimento embrionário normal.

Posteriormente, Martins et al. (2007) realizaram estudos inéditos com espermatozoides liofilizados de bovinos da raça Nelore no Brasil, comparando diferentes meios protetores para a liofilização. E pela primeira vez, conseguiram demonstrar que a solução de EGTA, bastante utilizada em camundongos, também era eficiente para preservar núcleo, acrossomo e mitocôndria de espermatozoides bovinos. Neste estudo, ao avaliarem as taxas de blastocistos após ICSI de espermatozoides liofilizados bovinos, provou-se que tanto a solução de EGTA quanto o meio suplementado de soro fetal bovino (SFB) e trehalose, eram capazes de fertilizar ovócitos maduros.

Embora a imobilização dos espermatozoides, removendo a cauda destes, imediatamente antes da ICSI não seja algo essencial para o sucesso da técnica, a maioria dos experimentos realiza a imobilização devido aos resultados obtidos de que o contínuo movimento dos espermatozoides dentro do ooplasma possa interferir na organização dos elementos e/ou promover algum tipo de perturbação na estrutura do ovócito (KIMURA & YANAGIMACHI, 1995).

Atualmente, já existem estudos com várias espécies, conservando os espermatozoides liofilizados com diferentes soluções de proteção, sendo que as melhores taxas de fecundação e formação embrionária foram obtidas utilizando trehalose e EGTA, associadas à ICSI (MARTINS et al., 2008).

Entretanto, apesar da redução drástica da motilidade e da destruição da membrana plasmática, foi comprovado posteriormente que a constituição genética cromossomal dos espermatozoides continuava intacta mesmo após o processo de liofilização, e possuindo todos os constituintes normais do cromossoma (LIU et al. 2004).

O campo da liofilização, especialmente de células espermáticas bovinas, ainda necessita de muito aprofundamento científico. Mas os avanços conquistados já refletem a importância da técnica para o futuro. Outra

estratégia em relação à liofilização associada à ICSI é a utilização do sistema piezo-drive, pois por intermédio das vibrações piezo-elétricas o espermatozoide liofilizado pode ser inserido no ovócito sem provocar lesões neste (MARTINS et al., 2008).

2.4. INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES

A ICSI é uma técnica que permite a utilização de distintos tipos espermáticos para promoção da fecundação, sendo necessário apenas que o núcleo destas células esteja viável. Portanto, podem-se utilizar tanto espermatozoides maduros, imaturos ou células em diferenciação como as espermátides. Os espermatozoides maduros podem ser obtidos através do ejaculado, os espermatozoides imaturos através do epidídimo, e as espermátides dos testículos (MARTINS et al., 2002).

Para a microinjeção, um ovócito é fixado horizontalmente na pipeta usando leve sucção. O corpúsculo polar deve ser orientado na posição de 6 ou 12 horas. A pipeta de injeção é então transferida da gota de gametas masculinos para a gota que contém o ovócito. Em seguida, a pipeta é localizada com a ponta direcionada para a posição de 3 horas em relação ao corpúsculo polar e colocada no mesmo foco que a membrana pelúcida, para que a pipeta seja empurrada contra a zona pelúcida até perfura-la e situar-se dentro do ovócito (MARTINS et al., 2002).

Apesar das inúmeras vantagens que a ICSI pode apresentar, há ainda diversos problemas que limitam o sucesso da técnica. Injúrias mecânicas ao citoesqueleto e organelas do citoplasma que podem ser causadas pela agulha de microinjeção causam uma perda embrionária após a transferência do embrião microfertilizado (IRITANI, 1994). A maturação citoplasmática também tem efeito importante, pois apesar da ICSI necessitar apenas de um núcleo íntegro em relação às células espermáticas, apenas ovócitos maturados são capazes de descondensar a cabeça espermática (PERREAULT, 1992; MCLAY & CLARKE, 1997).

Na espécie bovina, uma das duas teorias mais aceitas sobre o insucesso da técnica nessa espécie é devido à forma distinta do núcleo

espermático (achatado e grande) e a invisibilidade do ooplasma sob microscopia óptica. A outra teoria é sobre a possível dependência do número de pontes de dissulfeto na cromatina nuclear de espermatozoides bovinos para o desenvolvimento do pró-núcleo masculino dentro do ooplasma (MARTINS et al., 2002).

A principal falha de fecundação após a ICSI é, portanto, uma inadequada ativação dos ovócitos, possivelmente combinada com deficiente maturação citoplasmática *in vitro*, resultando em baixa descondensação da cabeça espermática e decréscimo no desenvolvimento embrionário. Um melhoramento da técnica de maturação e ativação do ovócito *in vitro* aumentaria as taxas de fecundação e formação de blastocisto após a ICSI (GÓMEZ, et al., 1998).

2.4.1. Técnica Piezo-ICSI

O piezo-drive é um dispositivo que promove a penetração da pipeta de injeção para dentro dos ovócitos através de vibrações piezo-elétricas. Esta técnica tem tornado a ICSI mais eficiente quando em comparação com a introdução manual (MARTINS, 2006). Segundo Kimura & Yanagimachi (1995), a injeção de espermatozoides utilizando o piezo-driver é bem menos traumática ao ovócito quando em comparação com a pipeta manual utilizada na ICSI convencional. Enquanto apenas 16% dos ovócitos sobreviveram ao método convencional, 80% sobreviveram ao método com piezo-driver.

Katayose et al. (1999) também realizaram experimentos comparando a técnica de ICSI convencional com a técnica de Piezo-ICSI em ovócitos bovinos. Foi examinada a eficácia após os ovócitos serem ativados e fertilizados e comprovou-se que a técnica de Piezo-ICSI foi mais eficiente que a ICSI convencional, obtendo mais embriões.

2.5. PRINCÍPIOS DO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO

Diferentemente da desidratação convencional, que depende do fenômeno de evaporação, a liofilização baseia-se no fenômeno da sublimação,

ou seja, da direta transição do estado sólido (gelo) para o estado gasoso, sem passar pelo estado líquido. Para evitar o estado líquido na liofilização é necessário gerar um vácuo durante o processo, mantendo a temperatura suficientemente baixa e à baixa pressão atmosférica. Além disso, é necessário fornecer suficiente energia (calor latente) dentro do equipamento, simultaneamente, para compensar a transição de fase (HOCHI et al., 2011).

O processo de liofilização consiste em três etapas principais: o congelamento, a desidratação primária e a desidratação secundária. Sendo a etapa de congelamento a mais crítica, pois a microestrutura formada durante o processo é quem determina a qualidade do produto final (KUMAR et al., 2011). Dentro das três etapas supracitadas, destacam-se os principais processos: congelamento, sublimação, dessorção (processo no qual uma substância é liberada em determinada superfície), bombeamento de vácuo, e condensação (LIU et al., 2008).

2.5.1. Congelamento

O congelamento do produto reduz a atividade química por redução da movimentação molecular. Em geral, o congelamento é definido como o processo de cristalização da água, resultando em cristais de gelo. Nesta fase, o produto é submetido a temperaturas inferiores ao próprio ponto de congelamento do material (TERRONI et al., 2011). Para o processo de liofilização, os espermatozoides são inicialmente pré-congelados em vapor de nitrogênio a cerca de -80°C , ao serem colocados em uma caixa de isopor, mantendo os frascos com espermatozoides a 5 cm da superfície líquida do nitrogênio (SIMÕES, 2012).

2.5.2. Desidratação Primária

Simultaneamente ao congelamento, gera-se vácuo no interior do equipamento e é também fornecido ao produto congelado, grande fonte de energia (calor latente) sob baixa pressão atmosférica, mantendo a temperatura acima da temperatura crítica, resultando no produto sublimado. O aumento da

temperatura acima deste nível resulta em defeitos de processamento indesejáveis durante a liofilização, enquanto que a diminuição da temperatura abaixo do nível pode resultar em inaceitável lentidão no processo de secagem (KRAMER et al., 2009).

Durante esse processo de sublimação, aproximadamente 90% do total de água do produto pode ser removida, sendo constituído quase que totalmente de 'água livre', contendo pouca quantidade de 'água ligada' (HOCHI et al., 2011). A remanescente quantidade de água, chamada de 'água ligada', será removida na desidratação final, ou secundária (HOCHI et al., 2008).

Conforme o gelo sublima, formam-se poros no interior do produto que está sendo desidratado. O objetivo da desidratação primária é encontrar condições de operação para o processo de liofilização minimizando a duração desta etapa pela maximização da velocidade de remoção da água sublimada na interface. Isto deve ser realizado sem que ocorra o derretimento da camada congelada (BOSS et al., 2004). A desidratação é uma etapa essencial, pois é responsável por reduzir a ocorrência de injúrias causadas pela formação de cristais de gelo intracelular (LOI et al., 2013).

2.5.3. Desidratação Secundária

A remanescente quantidade de 'água ligada' do processo de sublimação será removida durante essa etapa da liofilização. A 'água ligada' é quem limita a integridade estrutural do produto, portanto, qualquer interação físico-química entre a água e a matéria seca tem de ser quebrada antes da água ser completamente removida no processo chamado dessorção, o que requer mais energia que a necessária para o processo de sublimação. Nesta etapa, uma elevada temperatura, sob baixa pressão atmosférica (inferior àquela fornecida na desidratação primária), é fornecida ao produto sublimado para remover a umidade sublimada e resultar no produto liofilizado final (HOCHI et al., 2008). A desidratação secundária inicia-se, teoricamente, quando todo o gelo foi removido por sublimação (BOSS et al., 2004).

O recipiente do produto liofilizado deve ser selado de forma adequada, seja sob vácuo ou após enchimento com gás não reativo, como nitrogênio ou argônio. Dessa forma, o produto pode ser preservado, teoricamente, numa

prateleira durante anos, a 4°C, ou em temperatura ambiente quando transportados por curtos períodos (KANEKO & NAKAGATA, 2006; HOCHI et al., 2011).

2.6. ESTRUTURA ESPERMÁTICA

Os espermatozoides apesar de variarem entre as espécies são formados dentro dos túbulos seminíferos nos testículos. Quando completamente desenvolvidos, são células alongadas, e consistem basicamente de duas estruturas: uma cabeça achatada contendo o núcleo e uma cauda com o aparelho locomotor. A cauda do espermatozoide é ainda subdividida em: colo e peças intermediária, principal e terminal (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

A principal característica da cabeça do espermatozoide é o núcleo achatado de forma oval, contendo o DNA. O acrossomo trata-se de uma fina cobertura de dupla camada que envolve o núcleo espermático, e contém as enzimas essenciais para o processo de fertilização como acrosina, hialuronidase e outras (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Em relação à cauda, as peças intermediárias juntamente com a peça principal formam o axonema, que é composto por nove pares de microtúbulos, mais dois pares centrais. Este conjunto de microtúbulos e as densas fibras da peça intermediária são recobertos por grande quantidade de mitocôndrias dispostas em forma de hélice, responsáveis pela motilidade espermática (MARTINS, 2006).

2.7. DANOS DECORRENTES DA CRIOPRESERVAÇÃO

Os espermatozoides ao serem criopreservados são expostos, além do congelamento, às concentrações de crioprotetores e ao descongelamento. Estes diversos processos podem afetar a viabilidade e estabilidade celular, entretanto, os danos celulares são decorrentes principalmente do comportamento da água sob condições de baixas temperaturas. A crioinjúria ocorrida durante os processos de congelamento e descongelamento é um processo letal relacionado à formação dos cristais de gelo intracelular, os quais

são capazes de alterar as estruturas da membrana plasmática, modificando o fluxo de água para o meio extracelular e aumento da concentração intracelular de solutos (WATSON, 2000).

2.8. FUNÇÃO E INTEGRIDADE DOS ESPERMATOZOIDES APÓS A LIOFILIZAÇÃO

Os espermatozoides liofilizados passam por exposição ao congelamento, desidratação completa (primária e secundária), além de armazenamento a longo prazo e reidratação. Esta série de processos pode afetar negativamente tanto suas características estruturais como funcionais (HOCHI et al., 2011).

De acordo com resultados obtidos por MARTINS et al. (2007), o componente celular mais afetado pela liofilização foi a membrana plasmática dos espermatozoides. Além da membrana plasmática, a organização dos microtúbulos foi comprometida na maioria dos tratamentos realizados no experimento. E isto explicaria a ausência/reduzida motilidade dos espermatozoides liofilizados, pois são os microtúbulos as estruturas responsáveis pela movimentação espermática. Por outro lado, o acrossoma e as mitocôndrias foram bem preservados em todos os tratamentos. Nos tratamentos com trehalose, os acromossomas apresentaram-se mais intactos que nos outros tratamentos.

2.9. MEIOS PROTETORES NO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO

Por ser a única condição necessária para um desenvolvimento embrionário bem sucedido utilizando ICSI, a estabilização dos núcleos espermáticos por liofilização tem sido um dos maiores objetivos da criopreservação, entretanto, o sucesso ainda é limitado (CROWE, et al., 2001). Devido às escassas informações a respeito da liofilização espermática, principalmente em relação à de espermatozoides bovinos, vem surgindo muitos estudos que visam avaliar a estrutura e a funcionalidade dos espermatozoides bovinos conservados em diferentes meios protetores.

2.9.1. Substâncias núcleo-protetoras

Os primeiros protetores nucleares descritos para a liofilização espermática foram o Soro Fetal Bovino (SFB) e a Albumina Sérica Bovina (BSA). E atualmente, os principais tratamentos utilizados como substâncias núcleo-protetoras são: o soro fetal bovino, a solução não fisiológica quelante de cálcio chamada EGTA, a solução de trehalose 0,2M, e o TCM 199 (MARTINS et al., 2007).

Segundo estudos realizados por Martins et al. (2007), apesar dos microtúbulos serem mais afetados nos tratamentos com EGTA e trehalose, foram nestes tratamentos que o núcleo espermático apresentou-se mais bem conservado, chegando a apresentar cerca de 95% dos espermatozoides com DNA intacto nos tratamentos com trehalose 0,2M. Ou seja, o meio com trehalose não é capaz de evitar os danos na membrana plasmática, mas em compensação é capaz de garantir a estabilidade nuclear, característica essencial para viabilidade de espermatozoides liofilizados associados à ICSI.

À época, acreditou-se que a associação de trehalose e EGTA poderia melhorar a técnica de liofilização espermática (MARTINS et al., 2007), entretanto, após estudos realizados com EGTA suplementado de trehalose, concluiu-se que se trata de uma associação que, quando em concentrações apropriadas, melhora a integridade do DNA espermático, mas que isso não a torna capaz de melhorar a taxa de fertilização e nem de desenvolvimento embrionário (MEN et al., 2013).

2.10. PROTOCOLO DE LIOFILIZAÇÃO ESPERMÁTICA

Devido à grande dificuldade encontrada na preservação das estruturas celulares durante o processo de liofilização ainda não há um protocolo padrão bem definido, mas diversos estudos vêm sendo realizados a fim de melhorar a habilidade e a capacidade de desenvolvimento embrionário dos espermatozoides liofilizados. Para tanto, tem-se dado uma atenção especial para a solução de liofilização, pois já é sabido que algumas substâncias são

capazes de proteger o DNA espermático dos danos físicos causados pelo processo de liofilização (HARA et al., 2014).

Uma solução tampão contendo Tris-HCl, EGTA e NaCl, tem sido a mais utilizada nos dias atuais para a suspensão de espermatozoides e liofilização (KUSAKABE et al., 2001; KANEKO et al., 2003; KAWASE et al., 2007; MARTINS et al., 2007; HARA et al., 2011). Essa solução de liofilização consiste em: 10mM de Tris-HCl, 50mM de EGTA e 50mM de NaCl, com pH estabilizado em 8,0 (HARA et al., 2014). O ajuste do pH para 8,0 é feito pois Kaneko et al. (2003) comprovaram que os resultados em relação à integridade cromossomal e habilidade de desenvolvimento embrionário são melhores quando os espermatozoides são liofilizados em meio alcalino (pH entre 8,0-8,2).

O EGTA por ser um agente quelante de cálcio é essencial para prevenir a deterioração dos espermatozoides durante a liofilização e subsequente preservação à 4°C, principalmente por inibir a atividade das endonucleases (KUSAKABE et al., 2001; KANEKO & NAKAGATA, 2006;).

Kaneko & Nakagata (2006), realizaram estudos comparativos utilizando EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), em diferentes concentrações, como um substituto do EGTA na solução de liofilização. Os resultados desses estudos mostraram que o EDTA também é capaz de prevenir a fragmentação dos cromossomos espermáticos, além disso, concluíram que o EDTA é mais eficiente que o EGTA, devido à menor quantidade necessária para proporcionar a mesma proteção. Foi necessário apenas 1mM de EDTA, quantidade bem inferior aos 50mM de EGTA, para que a solução de liofilização fosse capaz de fornecer proteção durante o processo de liofilização e subsequente preservação.

Apesar das diferentes concentrações, soluções e até mesmo diferentes tempos utilizados, os protocolos baseiam-se em:

2.10.1. Avaliação da amostra de sêmen bovino

Para o processo de liofilização, a amostra de sêmen é avaliada previamente quanto à motilidade, vigor, alterações morfológicas, concentração e outras (SIMÕES, 2012). O ideal é que apenas amostras com mais que 80%

de motilidade e menos que 10% de anormalidade espermática sejam selecionadas para o processo (MARTINS et al., 2007).

2.10.2. Centrifugação da amostra

A amostra é então centrifugada em gradiente de Percoll (45-90%) para remoção de plasma seminal. Sequencialmente a amostra é ressuspensa por mais duas vezes em meio TALP (Tyrode's albumen lactate pyruvate), para capacitação dos espermatozoides e remoção residual de Percoll (MARTINS et al., 2007).

2.10.3. Adição da solução tampão de EGTA (ou derivado)

Após centrifugação do sêmen, remove-se o sobrenadante e é adicionada ao "pellet" de espermatozoides formado, a solução de liofilização, que na maioria dos estudos atuais é a solução tampão de EGTA (10mM de Tris-HCl, 50mM de EGTA e 50mM de NaCl, com pH estabilizado em 8,0) (HARA et al., 2014).

Segundo experimentos realizados por MARTINS et al. (2007) com bovinos Nelore, considerou-se ajustar a concentração para 10×10^6 espermatozoides/100 μ l solução de liofilização. Em alguns estudos a suspensão espermática (sêmen e solução de liofilização), adicionada a tubos de 1,5mL, é deixada por 10-30 minutos a 37°C para permitir que os espermatozoides se dispersem sobre a solução de liofilização (KANEKO & NAKAGATA, 2006; MARTINS et al., 2007). Já outros, preferem ressuspender os espermatozoides na solução de liofilização por duas vezes (HARA et al., 2014).

2.10.4. Liofilização

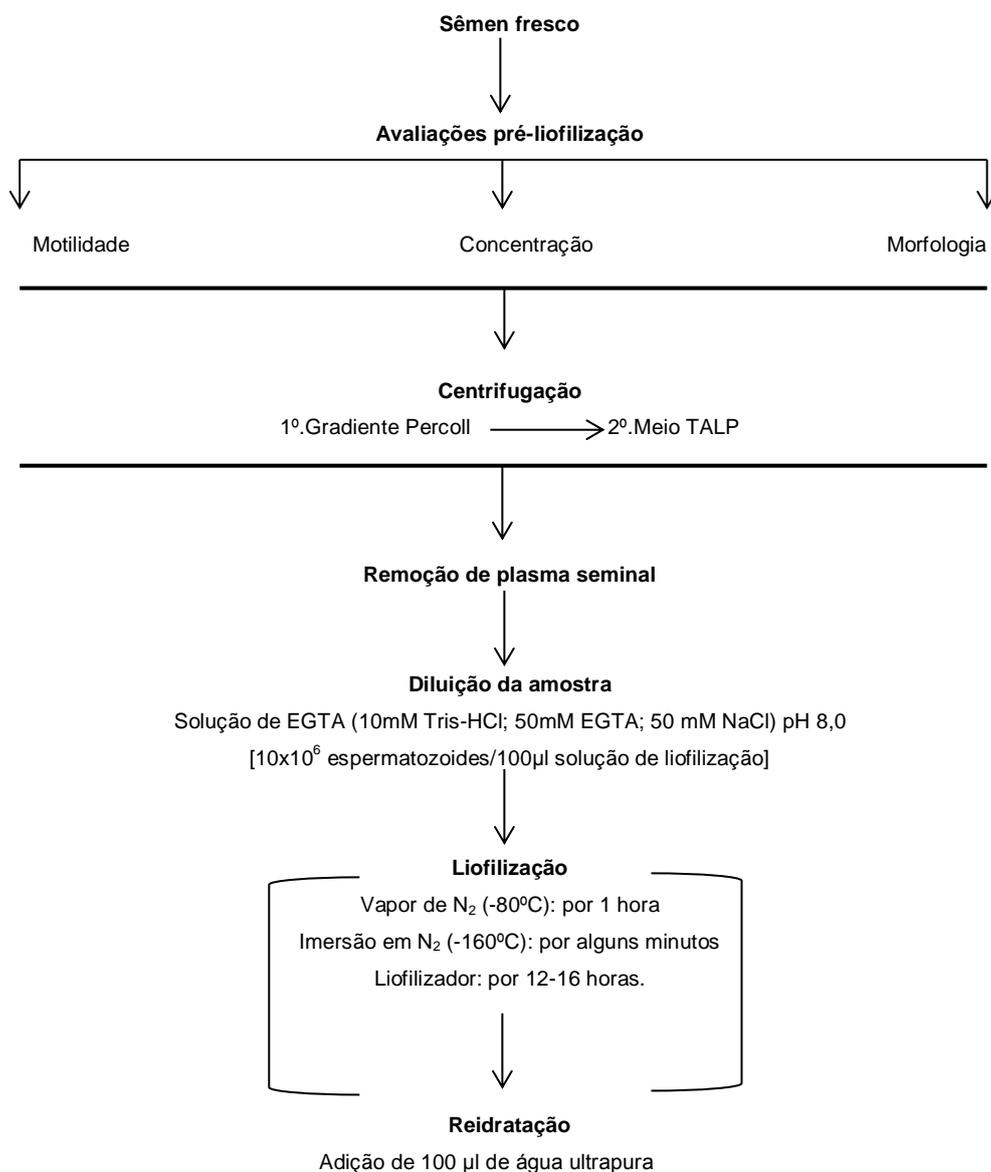
Posteriormente, expõe-se a amostra em vapor de nitrogênio líquido (-80°C) por aproximadamente 1 hora, para depois imergi-la por alguns segundos em nitrogênio líquido (-160°C) (KANEKO & NAKAGATA, 2006; MARTINS et al., 2007; SIMÕES, 2012). Então a amostra é colocada no aparelho de liofilização,

com a pressão previamente estabilizada, e após 12-16 horas de liofilização, o tubo com a amostra deve ser coberto com papel alumínio para ser armazenado a 4°C, podendo permanecer por meses antes de realizar a ICSI (MARTINS et al., 2007).

2.10.5. Reidratação e ICSI

Imediatamente antes de realizar a ICSI, a amostra de espermatozoides liofilizados é reidratada adicionando-se aproximadamente 100µl de água ultrapura (Milli-Q®). Realizam-se novamente as avaliações de motilidade, vigor, alterações morfológicas, concentração e outras, para em seguida centrifugar a amostra por 3 minutos (700 x g) e ressuspender o “pellet” com 0,5mL de meio TALP. Depois de ressuspendido centrifuga-se novamente, e então a amostra pode ser utilizada na ICSI (MARTINS et al., 2007). Todo o processo pode ser visualizado resumidamente no esquema abaixo.

Esquema 1. Passo-a-passo da liofilização



2.11. PERSPECTIVAS DA LIOFILIZAÇÃO ESPERMÁTICA NA REPRODUÇÃO BOVINA

Atualmente, já existem vários protocolos de criopreservação para espermatozoides de mamíferos. O mais utilizado mundialmente é o de criopreservação convencional, o qual exige para manutenção da condição de criopreservado, o nitrogênio líquido. Além do próprio custo inicial do nitrogênio líquido, os botijões de criopreservação requerem sua constante reposição,

devido à alta taxa de evaporação, o que contribui para o aumento no custo de manutenção. Outro fator limitante é a necessidade de mão-de-obra capacitada para manusear o botijão, pois se trata de um equipamento que deve ser manuseado com cautela, visto que há risco de acidentes envolvendo o nitrogênio líquido (LOI et al., 2013).

O principal fator limitante do botijão de criopreservação é o seu difícil deslocamento em escala mundial. Pois há a necessidade de um transporte especial para se preservar a qualidade em seu interior, o que acaba por favorecer o encarecimento do transporte e limitar a expansão de transferência genética entre países mais distantes (LOI et al., 2013).

A técnica de liofilização, portanto, pode ser revolucionária por possibilitar e facilitar essa troca de importantes linhagens genéticas entre estados, países e continentes. Por isso, vários grupos de pesquisa vêm buscando investir nesta técnica para conservação do germoplasma masculino, entretanto, ainda há necessidade de mais pesquisas na área para viabilizar a técnica (MARTINS, 2006).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos conhecimentos adquiridos nesta revisão bibliográfica, é possível dizer que a liofilização possui grande potencial de se tornar futuramente um dos melhores métodos de conservação de espermatozoides. A independência de nitrogênio líquido e, conseqüentemente, de botijões de criopreservação, é uma das principais vantagens que a técnica apresenta. Isto tornaria o transporte de sêmen muito mais fácil, dispensaria os elevados custos com aquisição e manutenção dos botijões de criopreservação, e também reduziria o risco de contaminação a que estamos sujeitos com estes. Somadas as inúmeras vantagens que a liofilização proporciona, a troca de materiais genéticos se expandiria a nível mundial, resultando em maiores quantidades de adeptos às biotecnologias como inseminação artificial.

Entretanto, ainda há grande necessidade de aprofundamento e aperfeiçoamento da técnica, especialmente na sua utilização na espécie bovina. De acordo com os estudos realizados por vários grupos de pesquisadores, a técnica de liofilização ainda é bastante agressiva a certas organelas do espermatozoide, como à membrana plasmática e à organização dos microtúbulos, o que resulta na limitação da motilidade destes espermatozoides após reidratação. Sem motilidade não é possível utilizá-los diretamente na inseminação artificial, sendo necessário microinjetá-los dentro de ovócitos maduros através da técnica de ICSI para viabilizar o desenvolvimento embrionário. A técnica de ICSI é outro fator problemático por não apresentar bons resultados na espécie bovina, isto devido a uma falha na ativação de ovócitos durante o processo de microinjeção.

Por isso, faz-se necessário um aperfeiçoamento de ambas as técnicas, mas em especial, da própria liofilização, com a produção de soluções de liofilização capazes de proporcionar uma efetiva proteção de todas as organelas essenciais, para viabilizar o uso destes espermatozoides diretamente na Inseminação Artificial, e assim torná-los comercialmente viáveis.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. Waking up to world coffee crisis. **St. Petersburg Times Latin America**. August 11, 2002.

AYROSA, A.M.I.B. Liofilização: Ciência ou arte? **Rev. Engenharia. São Paulo. FAAF**. 2003.

BOSS, E.A.; FILHO, R.M.; TOLEDO, E.C.V. Freeze drying process: real time model and optimization. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 43, p. 1475-1485. 2004.

CATT, J.W. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and related technology. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 239-250. 1996.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; OLIVER, A.E.; TSVETKOVA, N.; WOLKERS, W., TABLIN, F. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. **Cryobiology** v. 43, p. 89-105. 2001

FURST, R.; CARVALHO, G.R.; FURST, M.C.O.; RUAS, J.R.M.; BORGES, A.M.; MAFILLI, V. Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, p.599-607, 2005.

GÓMEZ, M.C.; CATT, J.W.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Cleavage, development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. **Theriogenology** v. 49, p.1143-1154. 1998.

HAFEZ, E.S.E. e HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7ª.ed. Barueri, SP: Manole, 2004.

HARA, H.; ABDALLA, H.; MORITA, H.; KUWAYAMA, M.; HIRABAYASHI, M.; HOCHI, S. Procedure for Bovine ICSI, not sperm freeze-drying, impairs the function of the microtubule-organizing center. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, 2011.

HARA, H.; TAGIRI, M.; HWANG, I.; TAKAHASHI, M.; HIRABAYASHI, M.; HOCHI, S. Adverse effect of cake collapse on the functional integrity of freeze-dried bull spermatozoa. **Cryobiology** (article in press). 2014.

HOCHI, S.; ABDALLA, H.; HARA, H.; HIRABAYASHI, M. Challenging Endeavour for Preservation of Freeze-Dried Mammalian Spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, 2011.

HOCHI, S.; WATANABE, K.; KATO, M.; HIRABAYASHI, M. Live rats resulting from injection of oocytes with spermatozoa freeze-dried and stored for one year. **Molecular reproduction and development**, v. 75, p. 890-894, 2008.

IRITANI, Akira. History and efficiency of microassisted fertilization in mammals. **Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 8, p.1-12. 1994.

KANEKO, T.; WHITTINGHAM D.G.; YANAGIMACHI, R. Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. **Biology of Reproduction** v. 68, p.136–139. 2003

KANEKO, T.; NAKAGATA, N. Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent. **Cryobiology** v.53, p. 279-282. 2006.

KANEKO, T.; SERIKAWA, T. Long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. **Cryobiology** v. 64, p. 211-214, 2012.

KATAYOSE, H.; MATSUDA, J.; YANAGIMACHI, R. The ability of dehydrated hamster and human sperm nuclei to develop into pronuclei. **Biology of Reproduction** v.47, p.277-284. 1992.

KATAYOSE, H.; YANAGIDA, K.; SHINOKI, T.; KAWAHARA, T.; HORIUCHI, T.; SATO, A. Efficient injection of bull spermatozoa into oocytes using a piezo-driven pipette. **Theriogonology**. v. 52, p.1215-1224, 1999.

KAWASE, Y.; HANI, T.; KAMADA, N.; JISHAGE, K.; SUZUKI, H. Effect of pressure at primary drying of freeze-drying mouse sperm reproduction ability and preservation potential. **Reproduction**. v. 133, p.841-846, 2007.

KESKINTEPE, L.; PACHOLCZYK, G.; MACHNICKA, A.; NORRIS, K.; CURUK, M. A.; KHAN, I.; BRACKETTE, B. G. Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. **Biology of Reproduction**. v.67, p.409–415, 2002.

KIMURA, Y.; YANAGIMACHI, R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. **Biology of reproduction**, v. 52, p. 709-720, 1995.

KRAMER, T.; KREMER, D. M.; PIKAL, M. J.; PETRE, W. J.; SHALAEV, E. Y.; GATLIN, L. A. A procedure to optimize scale-up for the primary drying phase of lyophilization. **Journal of pharmaceutical sciences**, v.98, p. 307-318, 2009.

KUMAR, G.P.; PRASHANTH, N.; KUMARI, B.C. Fundamentals and Applications of Lyophilization. **Journal of Advanced Pharmaceutical Research.**, v. 2, p.157-169, 2011.

KUSAKABE, H.; SZCZYGIEL, M.A.; WHITTINGHAM D.G.; YANAGIMACHI, R. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v.98, p.13501-13506, 2001.

LEIBO, S.P.; SONGSASEN, N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. **Theriogenology**, v. 57, p.303-326. 2002.

LEIDL, M.D. The current situation of freeze drying of semen. **Vaccum**, v.4, p.48-52. 1954.

LIU, J.; KUSAKABE, H.; CHANG, C.; SUZUKI, H.; SCHMIDT, D.W.; JULIAN, M.; PFEFFER, R.; BORMANN, C.L.; TIAN, X.C.; YANAGIMACHI, R.; YANG, X. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. **Biology of Reproduction** v.70, p.1776-1871. February, 2004.

LIU, Q. C.; CHEN, T. E.; HUANG, X. Y.; SUN, F. Z. Mammalian freeze-dried sperm can maintain their calcium oscillation-inducing ability when microinjected into mouse eggs. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v.328, p.824–830. 2005.

LIU, Y.; ZHAO, Y.; FENG, X. Exergy analysis for a freeze-drying process. **Applied Thermal Engineering**, v. 28, p. 675-690, 2008.

LOI, P.; LUSO, D.; CZERNIK, M.; ZACCHINI, F.; PTALK, G. Towards storage of cells and gametes in dry form. **Trends in Biotechnology Cell Press.** v. 31, p. 688-695. December, 2013.

MACEDO A.B.; MORITZ, D.E. Desenvolvimento de uma formulação de derivados lácteos com propriedades funcionais em pó (iogurte e leite fermentado) corado com biopigmento monascus. **Cadernos Acadêmicos, Palhoça**, SC, v.4. 2012.

MARTINS, C.F.; SILVA, A.E.D.F.; RUMPF, R. **Injeção intracitoplasmática de células espermáticas e suas aplicações na reprodução dos bovinos**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002.

MARTINS, C.F. **Liofilização de espermatozoides bovinos: viabilidade estrutural e funcional**. Tese de doutorado pela Universidade de Brasília - Faculdade de Ciências Biológicas. Brasília/DF, 2006. 110p.

MARTINS, C.F.; BÁO, S.N.; DODE, M.N.; CORREA, G.A.; RUMPF, R. Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm. **Theriogenology**. v. 67, p. 1307-1315. 2007.

MARTINS, C.F.; DODE, M. N.; JUNIOR, R. G.; BÁO, S. N.; SERENO, J. R. B.; RUMPF, R. **Conservação de espermatozoides bovinos por liofilização (freeze-drying)**. Embrapa Cerrados, 2008.

MAZUR, P.; LEIBO, S.P.; SEIDEL, G.E. Jr. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. **Biology of Reproduction** v.78, p.2-12, 2008 (published online before print 26 September 2007)

MCLAY, D.W. and CLARKE, H.J. The ability to organize sperm DNA into functional chromatin is acquired during meiotic maturation in murine oocytes. **Developmental Biology**, v. 186, p. 73-84. 1997.

MEN, N.T.; KIKUCHI, K.; NAKAI, M.; FUKUDA, A.; TANIHARA, F.; NOGUCHI, J.; KANEKO, H.; LINH, N.V.; NGUYEN, B.X.; NAGAI, T.; TAJIMA, A. Effect of trehalose on DNA integrity of freeze-dried boar sperm, fertilization, and embryo development after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology** v.80, p.1033-1044, 2013.

MERYMAN, H. T.; KAFIG, E. Special article freeze-drying of bovine spermatozoa. **Journal of reproduction and fertility**, v. 5, p. 87-NP, 1963.

PEGG, D.E. The history and principles of cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**. v.20, p.5-13, 2002.

PERREAULT, S.D. Chromatin remodeling in mammalian zygotes. **Mutation Research**, v.296, p. 43-55. 1992.

SIMÕES, B.D.C. **Liofilização como ferramenta de preservação de sêmen humano**. Dissertação Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde. 2012. 79f.

SOLA, M. C. **Manutenção de micro-organismos: conservação e viabilidade**. Seminários aplicados, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Goiás. 2012.

TERRONI, H. C.; DE JESUS, J.M.; ARTUZO, L.T.; VENTURA, L.V.; SANTOS, R.F.; DAMY-BENEDETTI, P. Liofilização. **Revista Científica UNILAGO**, 2011.

WAKAYAMA, T.; YANAGIMACHI, R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. **Nature Biotechnology**. v.16, p.639-641. 1998.

WARD, K. R. The importance of vacuum and the control of pressure in freeze-drying. **3rd Vacuum Symposium UK, Coventry**, 2012.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science** v.60, p. 481-492. 2000.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science**. v.60-61, p. 349-355. 2000.

5. RELATÓRIO DE ESTÁGIO

5.1. INTRODUÇÃO

O Estágio Obrigatório é uma disciplina do 10º semestre do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB). É de caráter obrigatório para conclusão do curso, totalizando 480 horas. Tem como objetivo possibilitar ao aluno vivenciar, adquirir e desenvolver conhecimentos teóricos e práticos, obtidos durante a graduação.

A escolha da área de reprodução animal e principalmente a biotecnologia da reprodução teve como objetivo aprofundar os conhecimentos adquiridos durante a graduação e vivenciar o dia-a-dia desse campo de atuação.

A Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), criada em 26 de Abril de 1973, possui sede em Brasília e em mais 47 unidades de pesquisa e serviços espalhadas em todas as regiões do Brasil. A unidade localizada em Brasília, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) tem como missão viabilizar o desenvolvimento e inovação na área de recursos genéticos voltados para a sustentabilidade da agropecuária brasileira. A atuação da Embrapa é nacional e internacional, sendo então referência por suas patentes, pesquisas e outros serviços (EMBRAPA, 2011).

Nos anos 70, a Food and Agriculture Organization (FAO) das Nações Unidas, estimulou o estabelecimento de uma rede mundial de Centros para Conservação de Recursos Genéticos, em regiões consideradas de alta variabilidade genética. Neste contexto, em 22 de Novembro de 1974, a Embrapa criou o Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), que mais recentemente adotou a assinatura Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia está localizada no Parque Estação Biológica, ao final da Asa Norte, próximo ao lago Paranoá. A unidade possui atualmente, uma área total construída superior a 30.000m², onde se destacam:

- Prédio da Administração;
- Auditório Assis Roberto de Bem;
- Biblioteca Especializada;
- Conjunto de prédios de apoio: guaritas de acesso com segurança 24h, oficinas, garagem para veículos de frota, galpões, almoxarifado, depósitos, abrigos para grupos geradores de energia, incinerador e depósito de Material Radioativo;
- Instalações e recursos de apoio à pesquisa: 28 Casas de vegetação, 14 Telados, 1 Estufa;
- Instalações e prédios de áreas técnicas e de pesquisa:
 - Prédio da Biotecnologia – PBI
 - Prédio do Controle Biológico I – PCB I
 - Prédio do Controle Biológico II – PCB II
 - Prédio da Conservação de Germoplasma – PCG
 - Prédio da Coleta e Caracterização de Germoplasma
 - Prédio da Quarentena de Germoplasma
 - Prédio da Informática
 - Prédio da Botânica e Ecologia – (PBE)
 - Fazenda Sucupira*

O Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem está situado a 35km do Plano Piloto, em Brasília, e possui uma área total de 1.800 ha e área construída de mais de 2.000m². Além do Laboratório de Reprodução Animal, o Campo Experimental Sucupira Também abriga raças de animais domésticos ameaçadas de extinção (bovinos, suínos, ovinos, equinos, caprinos e asininos) do Banco Brasileiro de Germoplasma Animal e alguns bancos de espécies florestais nativas e exóticas.

5.2. IDENTIFICAÇÃO DO ESTÁGIO

Área de estágio: Biotecnologia de Reprodução Animal

Local: Laboratório de Reprodução Animal I (EMBRAPA CENARGEN)

Laboratório de Reprodução Animal II (FAZENDA SUCUPIRA)

Orientador acadêmico: Prof. Dr. Ivo Pivato

Supervisor de estágio: Dr. Ricardo A. Figueiredo

Período de estágio: 26 de Fevereiro de 2014 a 30 de Maio de 2014

Carga Horária: 40 horas semanais

5.3. PLANO DE TRABALHO

Nome do supervisor do estágio: Ricardo A. Figueiredo

Projeto: 031201019003

Atividades a serem desenvolvidas:

- Acompanhar as atividades de superovulação e transferência de embriões bovinos
- Acompanhar as atividades de produção *in vitro* de embriões
- Acompanhar o manejo reprodutivo do rebanho bovino do CES
- Acompanhar a avaliação andrológica e congelamento de sêmen de touros
- Acompanhar experimentos de avaliação da função ovariana e produção de embriões
- Elaborar relatório simplificado
- Participar do "Journal Club".

5.4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

5.4.1. Aspiração de Ovócitos

No dia 27 de Fevereiro, primeiro dia oficial de estágio, foi realizado pela manhã o reconhecimento da infraestrutura laboratorial da Fazenda Sucupira.

Neste mesmo dia, foi possível acompanhar e realizar a aspiração de ovócitos de ovários bovinos oriundos de abatedouros.

A coleta de ovários bovinos foi realizada imediatamente após a fêmea ser abatida, na linha de abate. Ao instante em que o abdômen é aberto pelo magarefe, o ovário é removido com o auxílio de uma tesoura. Os ovários foram então armazenados em um vidro contendo solução salina a 0,9% e sob temperatura de 33 a 36°C. O transporte dos ovários até o laboratório deve ser feita em até 3 horas para que a viabilidade dos ovócitos não se alterem.

Depois de chegar ao laboratório, os ovários foram colocados em banho-maria (figura 1), para manter a temperatura, e então aspirados individualmente através de uma agulha 40x12mm acoplada a uma seringa. O líquido folicular coletado da aspiração foi colocado em tubos de ensaio, deixados em posição vertical no banho-maria. É importante lembrar, que previamente ao início da aspiração, é necessário que o banho-maria tenha sido ligado com pelo menos 2 horas de antecedência. Após completar os tubos com o líquido aspirado, retirou-se o sobrenadante com o auxílio de um pipetador.



Figura 1: Banho-maria e ferramentas para aspiração folicular.

O conteúdo aspirado foi então colocado em placas de Petri (grande), contendo TCM-HEPES, um meio de lavagem, e 10% de soro fetal bovino, para que os ovócitos possam ser rastreados ao microscópio. Os ovócitos rastreados foram colocados em outra placa de Petri, menor à primeira, contendo 2-3ml de meio de lavagem. Depois de rastreados, esses ovócitos foram selecionados e separados em grupos de acordo com a classificação do grau destes. Os ovócitos podem ser classificados em grau 1, 2, 3, desnudos ou atrésicos. A

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

Grau 1: *cumulus* compacto, contendo mais de três camadas de células e citoplasma do ovócito apresenta-se homogêneo.

Grau 2: *cumulus* compacto, parcialmente presente ao redor do ovócito, 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.

Desnudo: o citoplasma possui granulações homogêneas, porém as células do *cumulus* estão ausentes.

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

Os ovócitos selecionados para maturação *in vitro* (MIV) são aqueles de grau 1 e 2. Depois de selecionados foram transferidos para placas de Petri, e lavados em três gotas de meios de maturação, como o TCM, para então serem maturados por 22 a 24 horas em estufas a 38,5°C com 5% de CO².

5.4.2. Produção *in vitro* de embriões

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

5.4.2.1. Maturação *in vitro* (MIV)

A MIV é o processo caracterizado por transformações celulares e moleculares do complexo *cumulus*-ovócito, que se inicia no momento da coleta do ovócito. Com a quebra da vesícula germinativa, a meiose é retomada dando início ao processo de maturação. Os ovócitos de grau I e II são geralmente colocados em gotas de 200µl de meio de maturação para o banho destes. Após a lavagem, foram transferidos para cada gota de meio MIV aproximadamente 25 a 30 ovócitos, e essas gotas foram cobertas com óleo

mineral. Os ovócitos permaneceram por 20 a 22 horas no meio de maturação em estufa (a 39°C, com 5% de CO₂).

Após a maturação, realizou-se a capacitação dos espermatozoides criopreservados, para prepará-los para a FIV. O método utilizado para preparação do sêmen para a FIV consistiu em: gradiente de densidade, Percoll 45% e 90%, previamente preparados com 2 horas de antecedência à fecundação *in vitro* (FIV).

5.4.2.2. Fecundação in vitro (FIV)

Depois de estabilizado o meio, retirou-se a palheta de dentro do botijão, contendo nitrogênio a -196°C, e colocou-se imediatamente em um recipiente contendo água a aproximadamente 35°C, deixando por cerca de 30 segundos. Feito isso, cortou-se a palheta para despejar o conteúdo em microtubos (ependorf). Colocou-se o sêmen sobre a coluna de Percoll e levou à centrifuga (9000rpm/5min). Retirou-se o “pellet” e ressuspendeu-o em 1mL de meio CAP (meio para capacitação), pois como o Percoll é uma substância tóxica é necessário utilizar um meio básico para neutralizar a ação tóxica do Percoll. Depois de colocado em meio CAP, centrifugou-se novamente a 9000rpm/5min, retirando posteriormente o sobrenadante e acrescentando em torno de 100µl de FEC (meio de fecundação) final. Avaliou-se a motilidade e o vigor do sêmen, para depois realizar a contagem de espermatozoides na câmara de Neubauer e calcular a concentração espermática e a dose inseminante.

Depois de capacitados, microinjetou-se os espermatozoides dentro dos oócitos pré-selecionados e levou à estufa novamente, para ficarem incubados em meio de fecundação por 12 a 18 horas.

5.4.2.3. Cultivo in vitro (CIV)

Após essas 18 horas de co-cultivo, os prováveis zigotos foram retirados do meio FIV, levemente pipetados e lavados em 2 a 3 gotas do meio SOF (synthetic oviduct fluid), para remover os espermatozoides e transferir os

zigotos para a gota de cultivo embrionário. No D2, 48 horas após a inseminação da FIV, os zigotos foram avaliados quanto à clivagem e calculou-se a taxa de blastocisto em D6, D7 e D8 (figuras 2, 3 e 4). A partir de D7-D8 os embriões formados já estão aptos para serem inovulados em receptoras, ou até mesmo criopreservados.



Figura 2: Avaliação PIVE - dia 6

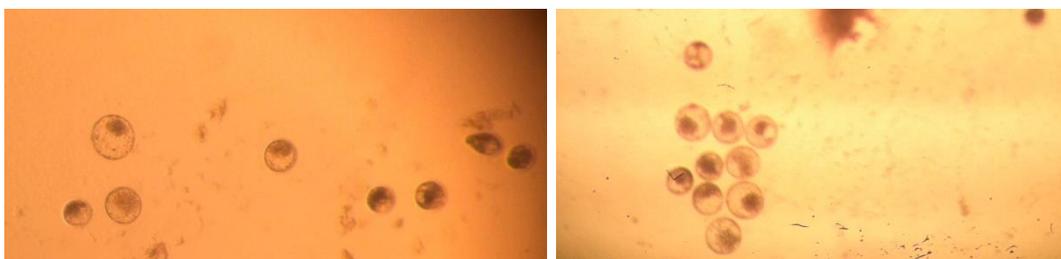


Figura 3: Avaliação PIVE - dia 7



Figura 4: Avaliação PIVE - dia 8

5.4.3. Ultrassonografia

O acompanhamento do exame de ultrassonografia (figura 5) em vacas receptoras foi realizado para avaliar o estado reprodutivo destas e verificar se as mesmas estavam aptas para receber os embriões pré-selecionados. Utilizou-se também a técnica de Ultrassonografia com Doppler para observar a

irrigação dos possíveis corpos lúteos. Depois de avaliada a condição das vacas, realizou-se a transferência de embriões.

O método de ultrassonografia ou ecografia é um método de diagnóstico para exploração de estruturas, através da emissão de ultrassom e captação de ecos. Além disso, permite a avaliação do tamanho, da forma, da localização e da consistência de órgãos em funcionamento ou o monitoramento de suas funções e o registro de imagens para ser utilizado em atestados em ou laudos clínicos, como diagnóstico de gestação, dinâmica folicular e outros.



Figura 5: Aparelho de US

5.4.4. Transferência de Embriões

A transferência de embriões é uma biotécnica baseada no princípio da multiplicação da progênie de fêmeas consideradas superiores dentro de um rebanho. Fundamenta-se na obtenção de embriões de uma fêmea doadora para em seguida transferi-los para fêmeas receptoras, com a finalidade de completar o período de gestação. Avaliando a importância do melhoramento genético do rebanho esta técnica é a mais acessível e proporciona o melhor aproveitamento de uma doadora, multiplicando seu material genético.

Para realizar a transferência de embriões, inicialmente realiza-se a anestesia epidural, aproximadamente 4mL de lidocaína. Assim que a cauda do animal apresentar flacidez, pode-se prosseguir com a transferência do embrião. Para transferir um embrião, utiliza-se um inovulador, devidamente montado e com o embrião em seu interior. Com o auxílio do aparelho de ultrassom, verifica-se qual dos ovários contém o corpo lúteo, pois será no corno de

mesmo lado que o embrião deverá ser depositado.

5.4.5. Inseminação Artificial por Tempo Fixo (IATF)

Durante o período de estágio foi possível acompanhar o protocolo completo de inseminação artificial por tempo fixo (IATF) em vacas de raça Nelore. Trata-se de uma técnica que promove a sincronização da ovulação das fêmeas após a administração de medicamentos em dias predeterminados, evitando a necessidade de observação de cio. Há diversos protocolos de IATF sendo utilizados atualmente. Desta forma é possível otimizar a mão-de-obra, padronizar lotes de bezerros, reduzir intervalo entre partos, entre outras vantagens.

5.4.6. Palpação Retal

Em rebanhos bovinos, uma das rotinas mais requisitadas é o diagnóstico de gestação feito por palpação retal (figura 6). A técnica permite confirmar a presença de gestação e a fase gestacional, e também identificar possíveis problemas reprodutivos. Pela palpação retal podemos observar certas características em diferentes estágios de gestação, como:

- 32 dias: Ao realizar o beliscamento (deslizamento do cório-alantoide sobre a parede do útero) observa-se a presença de parede dupla.
- 45 dias: Já é possível observar uma assimetria entre os cornos devido a formação da pequena bolsa.
- 90 dias: O útero pode ser contornado em toda sua extensão. Neste período há uma grande bolsa formada.
- 120 dias: O útero adquire um formato de balão e deixa de ser contornável. Encontra-se distendido e tenso.
- 5 meses: A cervix está pesada e afunilada para baixo devido a descida do feto.
- 6 meses: O feto atinge a região abdominal.

- 7 meses: O feto começa a se reposicionar na região pélvica, e neste período já é possível palpar a cabeça do feto.



Figura 6: Palpação retal

5.4.7. Exame Andrológico

A realização do exame andrológico de touros é muito importante para a avaliação da capacidade reprodutiva destes. O exame andrológico completo fundamenta-se na avaliação de todos os fatores que contribuem para a função reprodutiva normal. Resumidamente, faz-se a anamnese, o exame clínico geral, e posteriormente segue-se ao exame do sistema reprodutor realizando a inspeção e a palpação dos órgãos genitais externos. Foi possível acompanhar duas aulas de exame andrológico durante o período de estágio na fazenda, utilizando alguns dos equipamentos ilustrados na figura abaixo.



Figura 7: Equipamentos para exame andrológico

5.4.8. Coleta e congelamento de sêmen

Ao acompanhar um experimento de doutorado no Centro de Conservação, foram observadas várias coletas de sêmen bovino, por dois métodos diferentes, vagina artificial e eletroejaculador. Em ambos os métodos tive a oportunidade de realizar, ao menos uma vez, a coleta e acompanhar as avaliações feitas, inclusive o congelamento de sêmen. Em outros dias, também tive a oportunidade de realizar algumas coletas de sêmen ovino por vagina artificial (figura 8).



Figura 8: Coleta de sêmen ovino por VA (vagina artificial)

5.4.9. “Journal Club”

Ao todo, foram 13 participações no “Journal Club”. Trata-se de uma reunião semanal realizada todas as quartas-feiras no PBI, onde mestrandos, doutorandos, pós-doutorandos e estagiários apresentam artigos científicos aos demais estudantes, para que ao final realizem uma discussão sobre o conteúdo e sobre as metodologias aplicadas e também sobre possíveis adaptações a serem implantadas no laboratório de reprodução animal da Embrapa. Em certas situações são apresentados dissertações de mestrado, doutorado, pós-doutorado. É uma reunião de extrema importância, por ser uma oportunidade de trocar ideias, de discutir diferentes pontos de vista, e confluir em melhorias para o laboratório e para os métodos utilizados.

5.4.10. Outros

Durante o período de estágio, foi possível acompanhar diversas atividades. Todas me agregaram conhecimento, e com certeza contribuíram muito para minha formação profissional. Quando na fazenda, tive a oportunidade de trabalhar e aprender sobre o manejo de ovinos, como realizar vermifugação, vacinação, tratamento de cascos, aplicação de medicamentos, ultrassonografia para diagnóstico de gestação, tratamento de linfadenite, coleta e congelamento de sêmen de machos, além dos cuidados neonatais realizados durante a época de parição das ovelhas. Tive também a oportunidade de acompanhar uma cesariana por via para-mamária de uma cabra.

Ainda na fazenda, acompanhei a realização de laparoscopia em bezerras para aspiração folicular (figura 9). E também de diversos procedimentos rotineiros, como cura de umbigo, aplicação de medicamentos, coleta de sangue, palpação retal, entre outros.



Figura 9: Aspiração folicular *in vivo* (por laparoscopia)

Quando no laboratório, acompanhei diversos experimentos de mestrado, doutorado, como: produção *in vitro* de embriões, transferência nuclear (figura 10), congelamento de sêmen, vitrificação. Foi possível acompanhar diversas avaliações de espermatozoides, como fluorescência, morfologia, concentração, motilidade, entre outros.



Figura 10: Transferência nuclear

Abaixo, se encontram dois quadros que resumem quantitativamente as observações e/ou realizações das biotecnologias durante o estágio

Quadro 1: Rotina de atividades acompanhadas durante o estágio no LRA I, e quantidade de vezes observadas e/ou realizadas.

Bioteecnologias	Quantidade de dias não consecutivos de biotecnologias realizadas
Aspiração folicular	20
Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	20
Produção de meios	5
Clonagem	3
Limpeza do banho-maria	2
Limpeza da estufa	1
Limpeza e descarte de materiais de rotina	20
Produção de pipeta de manipulação	6
Morfologia espermática	15
Avaliação espermática por CASA	5
Fixação e coloração de ovócitos	3
“Journal Club”	13

Quadro 2: Rotina de atividades acompanhadas durante o estágio no LRA II, e quantidade de vezes observadas e/ou realizadas.

Bioteχνologias	Quantidade de dias não consecutivos de bioteχνologias realizadas
Aspiração folicular de ovários oriundos de abatedouro	15
Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	15
Aspiração folicular <i>in vivo</i> (videolaparoscopia)	1
Transferência de embriões	5
Casqueamento	4
Coleta de sêmen (vagina artificial)	10
Coleta de sêmen (eletroejaculador)	30
Produção de pipeta de manipulação	2
Ultrassonografia	38
Protocolo de IATF	30
Palpação Retal	30
Cesariana	1
Transfusão sanguínea	3
Vermifugação de ovinos	10
Coleta de sangue de bovinos	30
Criopreservação de sêmen	8
Lavagem e esterilização de materiais	2
Exame andrológico de touros	10
Castração de bovinos	2
Vasectomia de bovinos	2
Tratamento de linfadenite	3
US de carcaça	1

5.5. CONCLUSÃO

Apesar do curto tempo disponível, durante o estágio supervisionado tive a oportunidade de aprender sobre as mais diversas biotecnologias aplicadas à área de reprodução animal, e também de colocar em prática a teoria adquirida durante a graduação. A Embrapa, além de ser referência internacional em suas linhas de pesquisa, fornece aos estagiários um ambiente rico para o aprendizado. Os pesquisadores, alunos de mestrado/doutorado, e também funcionários, se apresentaram sempre disponíveis a ensinar, incentivar e responder quaisquer dúvidas, o que com certeza foi fundamental para o conhecimento obtido. Foi, portanto, uma experiência extremamente importante para a minha formação profissional e pessoal.