

Biotecnologia aplicada a pecuária bovina

*Carlos Frederico Martins
Luiz Gustavo B. Siqueira
Margot Alves Nunes Dode*

Introdução

O aumento da exigência mundial para produção de alimentos seguros e de forma sustentável tem obrigado a pecuária bovina a sofrer adaptações, buscando o aumento da eficiência reprodutiva e produtiva dos animais em áreas cada vez menores. Nesse sentido, as biotécnicas de reprodução animal têm contribuído para a produção de animais com genótipos superiores e com eficiência produtiva destacada. Atualmente, a tecnologia de produção de embriões bovinos tem combinado a reprodução assistida com técnicas celulares, moleculares e genômicas, permitindo a multiplicação de animais geneticamente valiosos, bem como a produção de animais transgênicos, com aplicação nas áreas biomédica e agropecuária. Além disso, os avanços na criopreservação de espermatozóides e embriões têm facilitado o processo de multiplicação de animais superiores, devido a facilidade de intercâmbio de material genético dentro e fora do país.

A inseminação artificial e a transferência de embriões são as técnicas que proporcionam os maiores ganhos genéticos para bovinos, pois, juntamente com os programas de teste de progênie, aumentam a pressão de seleção das raças. Atualmente, a técnica de produção *in vitro* de embriões bovinos tem se incorporado fortemente ao setor produtivo, tornando o Brasil o maior produtor de embriões por essa tecnologia. A técnica de fecundação *in vitro* também tem auxiliado no desenvolvimento do processo de clonagem animal, o qual tem sido utilizado comercialmente no país como uma tecnologia de multiplicação de animais geneticamente superiores e estratégicos dentro de determinadas linhagens.

Este capítulo tem o objetivo de apresentar e discutir detalhes das principais biotécnicas que impactam de forma prática a multiplicação de bovinos. Dessa forma serão abordadas as biotécnicas de criopreservação de germoplasma, inseminação artificial, transferência de embriões, fecundação *in vitro* e transferência nuclear (clonagem).

Criopreservação de genomas

A preservação de células em baixas temperaturas é denominada de criopreservação, uma área aplicada da criobiologia. Os avanços na tecnologia de criopreservação têm desenvolvido métodos que permitem manter uma variedade de células viáveis a baixas temperaturas. Nesse sentido, a criopreservação tem se tornado uma ferramenta fundamental para reprodução de bovinos, bem como para formação de criobancos genéticos para conservação animal *ex situ*, possibilitando o armazenamento de espermatozoides, oócitos, embriões e células somáticas. Essas células conservadas podem oportunamente ser utilizadas pelas biotécnicas de reprodução, tais como a inseminação artificial, transferência de embriões, fecundação *in vitro* e transferência nuclear, e, dessa forma, promover a multiplicação de animais com elevado mérito genético, bem como de animais em risco de extinção.

Criopreservação de espermatozoides

O relativo sucesso alcançado com a criopreservação de sêmen tem permitido avanços significativos no campo da agropecuária, tornando possível uma troca internacional de germoplasma de animais geneticamente superiores; da biotecnologia, por permitir uma eficiente estocagem de linhagens de murinos cientificamente importantes; da conservação de espécies em risco de extinção, por meio do banco de recursos genéticos; e da medicina reprodutiva humana (WOODS et al., 2004).

O espermatozoide é uma célula altamente polarizada e especializada com uma estrutura tripartida em cabeça, peça intermediária e cauda. Esse gameta perde a habilidade de biosíntese, reparo, crescimento e divisão celular durante a fase final da espermatogênese. Dessa forma, a conservação de espermatozoides requer uma redução

ou atraso do metabolismo das células espermáticas para gerar um prolongamento de sua vida (YOSHIDA, 2000).

Uma estocagem efetiva de sêmen no estado congelado implica em uma completa interrupção no processo de desenvolvimento das células espermáticas, que começam no testículo e continuam através do epidídimo e após a ejaculação. A criopreservação do sêmen pode ser considerada como uma lacuna entre o período de suspensão da animação espermática e o processo que demarca a continuidade do desenvolvimento, que eventualmente conduz a fecundação (VISHWANATH; SHANNON, 2000).

A maioria dos métodos de criopreservação de espermatozóides de mamíferos ainda consiste de vários passos não fisiológicos, que envolvem a adição hipertônica de um agente crioprotetor permeável (ACP), resfriamento, aquecimento e a remoção do ACP (WOODS et al., 2004). Teoricamente, tem sido possível calcular a adição mínima de ACP requerida antes do resfriamento para evitar os danos osmóticos, bem como a taxa ótima de resfriamento para evitar a formação de gelo intracelular. Um dos mais importantes princípios da criopreservação reside na necessidade de remover o máximo possível de água das células antes de proceder a sua congelação. Se essa desidratação não ocorrer, grandes cristais de gelo se formarão, lesando severamente a estrutura intracelular. No entanto, a remoção demasiada de água das células também pode ser deletéria (SEIDEL JUNIOR, 1984).

A fortuita descoberta do glicerol (POLGE; SMITH, 1949) como um efetivo agente crioprotetor introduziu um novo sistema de estocagem de sêmen, o qual prolonga a viabilidade espermática e mantém o potencial fecundante por longos períodos. Existe um argumento que espermatozóides estocados a $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$ (gelo seco) ou a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (nitrogênio líquido) mantêm seu potencial fecundante indefinitivamente. No entanto, outros especialistas consideram um período de tempo mais curto para os espermatozóides sobreviverem a baixas temperaturas e manterem o potencial fecundante. Outras evidências sugerem que esse fato pode ocorrer devido à inadequada manutenção da temperatura de estocagem.

Vários aspectos da criopreservação espermática têm sido estudados, tais como a composição química dos diluentes e seus efeitos sobre a

membrana plasmática, limites de tolerância osmótica, condutividade hídrica e a permeabilidade dos crioprotetores (GILMORE et al., 1999). Esses estudos sugerem que os espermatozóides de cada espécie têm diferentes propriedades criobiológicas, bem como apresentam variação quanto à sensibilidade a manipulação (ex, pipetagem, centrifugação), tolerância osmótica, e sensibilidade ao resfriamento (KATKOV; MAZUR, 1999; PHELPS et al., 1999).

De maneira geral, o sucesso da criopreservação da célula depende da velocidade da congelação e da composição da solução em que as células são congeladas. Inicialmente, a água extracelular congela no momento em que a célula se aproxima do ponto de congelação, removendo o líquido extracelular, fato que acarreta um aumento de osmolaridade. Com esse desequilíbrio osmótico, a água é retirada da célula para o compartimento extracelular, ocasionando uma diminuição do volume celular. Uma adequada desidratação celular depende da velocidade de congelação, de forma a não provocar uma lise da célula. No caso de um processo de congelação muito lento, o equilíbrio permanecerá constante e a célula ficará exposta ao crioprotetor e ao estresse osmótico por tempo prolongado, fato que poderá acarretar a morte celular. Ao contrário, no caso de uma congelação muito rápida, a desidratação será insuficiente e causará a formação de gelo intracelular, ocasionando a lise da célula na ocasião da descongelação (LOPEZ-BÉJAR et al., 1994). Para evitar o dano celular, mesmo com uma velocidade de descongelação controlada, há necessidade do emprego de crioprotetores. Mesmo com uma solução crioprotetora empregada, avaliações citológicas têm demonstrado lesões na membrana plasmática, região acrossomal e na configuração da cauda espermática (WILLOUGHBY et al., 1996).

A criopreservação espermática tem sido associada com sucesso com a tecnologia reprodutiva humana e bovina. A maioria dos protocolos utiliza uma curva lenta de resfriamento inicial (ex., 1 °C/min. a 5 °C/min.), que começa a partir da temperatura corporal ou temperatura ambiente, até atingir a temperatura de solidificação. Em seguida, após a formação inicial de gelo, faz-se necessária a adoção de uma taxa de resfriamento mais rápida (ex., 100-200 °C/min.), na presença de glicérol tamponado com gema de ovo e citrato de sódio. Com esse procedi-

mento, a taxa de sucesso tem sido satisfatória nessas espécies quando o sêmen congelado é utilizado na inseminação artificial ou fecundação *in vitro* (HOLT, 2000).

Um protocolo padrão tem sido idealizado para a criopreservação de sêmen de todas as espécies. Entretanto, aqueles destinados a criopreservação de sêmen de mamíferos apresentam limitações e produzem taxas de sucesso que variam entre as espécies e até individualmente dentro da mesma espécie. Em algumas espécies, tais como suína, um método apropriado ainda está por ser determinado, enquanto em outras espécies, como murina, um método que parece ser apropriado para uma linhagem falha em outra (CRITSER; MOBRAATEN, 2000). Essas informações indicam que um exame das propriedades criobiológicas dos espermatozoides, bem como um exame da exata natureza da crio-injúria espécie-específica, deve ser realizada para se determinar um apropriado protocolo de criopreservação (HOLT, 2000).

Apesar dos possíveis avanços na tecnologia de criopreservação de sêmen bovino, essa metodologia já é uma grande realidade para bovinocultura do Brasil. A maior aplicação da criopreservação de sêmen bovino está na possibilidade de utilização e disseminação de material genético de touros superiores por meio da inseminação artificial, melhorando o desempenho do rebanho de corte e de leite e trazendo, dessa forma, maior lucratividade ao pecuarista.

Criopreservação de embriões

No sistema de produção de bovinos, a criopreservação de embriões tem contribuído com o processo de seleção genética e tem reduzido significativamente os custos dos programas de cruzamentos, porque os embriões podem permanecer disponíveis até que as fêmeas receptoras estejam prontas naturalmente, evitando os custos com a sincronização hormonal do cio (WOODS et al., 2004). A criopreservação de embriões permite uma melhor exploração da fêmea doadora, pois os embriões excedentes dos programas de transferência de embriões e fecundação *in vitro* podem ser estocados, formando um banco genético que poderá ser utilizado em momento oportuno. Além disso, essa tecnologia garante com mais facilidade a importação e exporta-

ção de germoplasma de interesse. Uma vez que os custos são menores, há segurança higiênico-sanitária e menores riscos de transporte.

As técnicas de criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vivo* estão bem estabelecidas. Inicialmente, o glicerol foi o crioprotetor mais utilizado (BILTON; MOORE, 1979), entretanto, como os embriões devem ser lavados várias vezes para remover o glicerol antes da transferência para as fêmeas receptoras e, por causa da sua toxicidade, esse crioprotetor tem sido substituído pelo etilenoglicol. O etilenoglicol se difunde para dentro ou para fora do embrião com rapidez, permitindo a transferência direta dos embriões (sem lavagem fora da palheta), fornecendo taxas de prenhezess similares ao glicerol (VOELKEL; HU, 1992). Nesse caso, os embriões são resfriados a 0,3 °C por minuto até -36 °C para garantir a formação de poucos locais de gelo, seguido pela imersão em nitrogênio líquido (TOMINAGA, 2004). Após um rápido aquecimento (>300 °C por minuto), os embriões bovinos têm apresentado taxas de gestação superiores a 50%.

A aplicação comercial em grande escala da tecnologia de produção *in vitro* de embriões bovinos é altamente dependente de procedimentos adequados de criopreservação. A sobrevivência dos embriões produzidos *in vitro* e criopreservados pelo método lento tem sido bem menor do que os embriões produzidos *in vivo* (DINNYÉS et al., 1996; VAJTA et al., 1997). Há muitas diferenças morfológicas entre os embriões produzidos *in vitro* e os de origem *in vivo*, as quais podem afetar a sobrevivência aos procedimentos de criopreservação lenta (WRIGHT JUNIOR; ELLINGTON, 1995; THOMPSON, 1997). O estágio de mórula produzida *in vitro* apresenta menos células compactas, a sensibilidade da zona pelúcida à digestão enzimática é alterada, e os embriões produzidos *in vitro* são usualmente mais escuros e mais leves, possivelmente devido ao aumento do conteúdo lipídico (LEIBO; LOSKUTOFF, 1993). Além disso, os embriões produzidos *in vitro* apresentam menos complexos juncionais, sendo encontradas diferenças na expressão do gene connexin 43 (proteína de junção tipo gap) (WRENZYCKI et al., 1996). A presença de soro fetal bovino (SFB) no sistema de cultivo *in vitro* pode gerar vacuolização, escurecimento e menor compactação dos embriões. A redução na temperatura durante o processo de resfriamento pode causar mudanças físicas nas

membranas celulares, tais como separação dos componentes lipídicos que resultam em alteração da função da membrana plasmática (SCHIMSHICK; MCCONNELL, 1973).

Com as atuais técnicas *in vitro*, um grande número de embriões pré-implantacionais podem ser produzidos relativamente a baixos custos. Entretanto, os embriões produzidos *in vitro* são caracterizados pelo aumento da sensibilidade ao resfriamento e diminuição da tolerância a criopreservação quando comparados com os embriões produzidos *in vivo* (POLLARD; LEIBO, 1994). Nesse contexto, o maior obstáculo associado com essa tecnologia é a carência de métodos adequados para preservar os embriões provenientes do sistema *in vitro*. Dessa forma, há, no mínimo, duas abordagens para superar esse problema: melhorar os métodos de criopreservação ou melhorar a qualidade do embrião por meio da otimização do ambiente para produção dos embriões *in vitro*.

Até o presente, a congelação lenta e a vitrificação são comumente utilizados para preservar os embriões bovinos. A congelação lenta, que é mais amplamente utilizada, tem a vantagem de utilizar baixas concentrações de crioprotetores e permite a transferência do embrião na receptora logo após a descongelação (VOLKEL; HU, 1992). As taxas de produção de bezerros são levemente mais baixas após a transferência de embriões produzidos *in vivo* e criopreservados em comparação com a transferência de embriões frescos. No entanto, a congelação lenta de embriões produzidos *in vitro* tem reduzido as taxas de sobrevivência pós-descongelação, devido principalmente a sua susceptibilidade a formação de cristais de gelo (KASAI et al., 2002).

O processo da conservação embrionária por vitrificação tem surgido como grande alternativa para a criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. A vitrificação é a solidificação da solução, não pela cristalização, mas sim pela extrema elevação da viscosidade durante a congelação rápida. Embora a vitrificação elimine as injúrias dos cristais de gelo, a alta concentração de crioprotetores requeridos aumenta o risco dos danos osmóticos e tóxicos (KUWAYAMA et al, 1994). Comparações entre os dois métodos de criopreservação têm levado a diferentes resultados, mas parece que a vitrificação é mais

adequada para a conservação de embriões bovinos produzidos pela fecundação *in vitro* (DYNNÉS et al., 1996).

Na vitrificação, a toxicidade das altas concentrações de crioprotetores determina que as células somente podem ser expostas a solução crioprotetora por um curto período de tempo ou a um volume mínimo de solução (ARAV et al. 2002). Diferentes estratégias foram aplicadas para diminuir o volume e para submergir a amostra rapidamente no nitrogênio líquido, incluindo telas de microscópio eletrônico (MARTINO et al., 1996), *open pulled straw* (OPS) (VAJTA et al., 1998), *cryoloops* (FUCHINOUE et al., 2004), *cryotops* e *cryotips* (KUWAYAMA et al., 2005). Ambos os métodos têm se tornado alternativas viáveis em relação às abordagens tradicionais, especialmente para embriões produzidos *in vitro*, embriões micromanipulados e oócitos (CARVALHAIS et al., 2006; MARQUES et al., 2007).

Criopreservação de oócitos

A criopreservação de oócitos ainda é ineficiente em bovinos, sendo um dos grandes gargalos para a técnica de fecundação *in vitro* (FIV). O sucesso da criopreservação de oócitos tornaria a produção *in vitro* de embriões uma técnica completa.

Os oócitos têm uma menor permeabilidade tanto à água quanto aos agentes crioprotetores. Assim, os oócitos resfriados a baixa temperatura apresentam lesões em elementos do citoesqueleto, grânulos corticais e membrana plasmática (AMAN; PARKS, 1994). O rompimento nos grânulos corticais e membrana plasmática provavelmente conduzem a baixa taxa de fecundação e morte celular, respectivamente (VINCENT; JOHNSON, 1992). Muitos problemas foram encontrados e associados com o resfriamento e criopreservação de oócitos imaturos, maturados *in vitro* ou ovulados. Como exemplo é possível citar as anormalidades no fuso meiótico anormal, com desorganização dos microtúbulos e cromossomos (ROJAS et al., 2004; SUCCU et al., 2007), alteração na distribuição dos grânulos corticais e aumento da poliespermia (MAVRIDES; MORROL, 2005; MORATO et al., 2008). A criopreservação de oócitos em fase de vesícula germinativa ou em metáfase II, utilizando métodos de resfriamento lento, tem resultado em baixa sobrevivência.

O processo de vitrificação de oócitos vem sendo intensamente estudado e tem se tornado o método de eleição para conservação de oócitos bovinos, mesmo com os resultados ainda incipientes. Várias técnicas de vitrificação vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de evitar as crioinjúrias, aumentando as taxas de resfriamento e aquecimento. Além disso, a aplicação de crioprotetores menos tóxicos, bem como a combinação de dois ou três crioprotetores têm sido utilizadas (MORATO et al., 2008).

Vários estudos vêm apostando nas abordagens de vitrificação com rápidas velocidades de resfriamento. A aceleração da velocidade de diminuição das temperaturas pode reduzir as crioinjúrias, permitindo o uso de uma menor concentração de crioprotetores e diminuindo o tempo de exposição da célula ao crioprotetor. A utilização de pequenos volumes de solução de vitrificação permite um resfriamento mais rápido e a redução de fraturas celulares (ARAV et al., 2002).

Criopreservação de células somáticas

A criopreservação de células somáticas parece ser uma metodologia viável para vários tipos celulares. O procedimento prático de criopreservação de fibroblastos tem sido realizado pela adição de 5% a 10% de crioprotetor, tais como glicerol ou dimetilsulfóxido (DMSO) nas células em suspensão em meio de cultura, alocadas em pequenos tubos com poucos mL e em seguida depositado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em freezer. Apesar de empírico, este simples procedimento ainda é efetivo. Com esse procedimento, a taxa de resfriamento não pode ser controlada, porém para fibroblastos bovinos essa metodologia tem sido suficiente.

Inseminação artificial

A técnica de Inseminação Artificial (IA) é, por definição, a deposição mecânica do sêmen no aparelho genital feminino por meio de instrumentos especialmente desenvolvidos para este propósito. Atualmente, a IA é considerada a biotecnologia de reprodução assistida que causa o maior impacto em programas de melhoramento animal, como resultado da sua eficiente forma de dispersão de genes de animais de superior mérito genético.

Existem relatos de uso da inseminação artificial em equinos pelo povo Árabe ainda no século XIV. No entanto, o primeiro relato científico de uso da IA ocorreu em 1784, quando o italiano Lázaro Spallanzani obteve sucesso após inseminar artificialmente cadelas. Em bovinos, o primeiro nascimento de animais frutos de IA foi reportado em 1938 (PELI, 1938). A técnica de IA iniciou sua difusão para uso comercial a partir dos avanços em procedimentos de manipulação do sêmen e, principalmente, após a demonstração de que espermatozoides poderiam ser conservados a baixas temperaturas por longos períodos pelos pesquisadores Polge, Smith e Parker, em 1949.

No Brasil, o uso comercial da IA teve início na década de 1970 do século passado, e atualmente comercializam-se mais de 8,2 milhões de doses de sêmen no País, com uma evolução de 210,66%, quando comparados dados dos anos de 1989 e 2008 (ASBIA, 2008). Estatísticas mundiais indicaram que mais de 232 milhões de doses de sêmen congelado foram produzidas por ano em todo o mundo no início da atual década (THIBIER; WAGNER, 2000). Contudo, uma baixa porcentagem de matrizes do rebanho brasileiro é inseminada artificialmente (cerca de 5% a 6%), o que coloca em evidência a necessidade de melhor divulgação e difusão da técnica de IA para ser usada na grande parte do rebanho ainda sob regimes de monta natural.

O sucesso de um programa de IA resulta de cinco fatores básicos: eficiência de detecção deaios; habilidade do inseminador (mão de obra treinada); correta aplicação da técnica; fertilidade do sêmen; e fertilidade da fêmea. Nesse sentido, é importante a observância de todos os detalhes inerentes à correta aplicação da técnica, visto que a baixa eficiência em um destes cinco fatores básicos poderá implicar em resultados insatisfatórios.

Vantagens da inseminação artificial

As principais vantagens da técnica de Inseminação Artificial são de caráter zootécnico, econômico e científico. Vantagens de ordem zootécnica referem-se ao melhoramento genético que pode ser alcançado por meio da disseminação de sêmen de animais superiores para produção de leite ou de carne; a eficiência do ganho genético pelo uso de touros provados com base na sua progênie; a preservação de mate-

rial genético raro que poderá ser utilizado no futuro; a diminuição da movimentação de animais entre fazendas, diminuindo assim a disseminação de doenças; e também ao pacote de melhorias na escrituração zootécnica de uma propriedade quando a inseminação artificial é implantada (anotações deaios, acasalamentos, partos ocorridos, etc...).

Já vantagens de ordem econômica são resultantes da rapidez no melhoramento genético do rebanho, o que resulta em ganhos de produtividade em um reduzido período de tempo; do melhor custo-benefício da compra de sêmen e manutenção do botijão em relação à compra e manutenção de touros; do uso de reprodutores de alto padrão genético, que se tornaria economicamente inviável em muitas fazendas devido ao preço do reprodutor, ao passo que, a compra de doses de sêmen deste mesmo animal pode ser economicamente viável.

A terceira classe de vantagens, a científica, se justifica se considerarmos que a inseminação artificial é a base para a aplicação de outras biotécnicas de reprodução assistida, dentre as quais se destacam a transferência de embriões e a fecundação *in vitro*. A inseminação artificial foi a primeira biotecnologia a ser aplicada em larga escala, e por isso serve de base para o desenvolvimento tecnológico futuro.

Observação deaios e horário de inseminação

Considerando que a Inseminação Artificial irá substituir o uso de touros em monta natural no rebanho, deve-se estar atento à eficiência de detecção de estro (cio). Estudos que correlacionaram número, horário e duração de observações de estro com a eficiência de detecção indicaram que maiores taxas de detecção de estro são obtidas quando são realizadas cinco observações diárias, com trinta minutos de duração cada (VAN VLIET; VAN EERDENBURG, 1996). No entanto, por questões operacionais, atualmente recomenda-se no mínimo duas observações diárias de 30 a 40 minutos cada.

O sinal principal ou primário de estro é o aceite a monta. A fêmea bovina em cio permanece imóvel quando recebe monta do macho ou de suas companheiras de rebanho. Para facilitar a identificação da proximidade desse momento (o aceite a monta), existem alguns sinais secundários que devem ser observados. Entre esses se destacam: montar em outras fêmeas, inquietação, nervosismo, mugido fre-

quente, movimentar-se acima do normal, afastamento do rebanho, vulva edemaciada (inchada), presença de muco saindo pela vulva, cauda erguida, posição de lordose, urinar com frequência, descansar o queixo sobre a região lombar das companheiras, posição de luta (cabeça-a-cabeça com outras fêmeas). Todos esses fatores irão ajudar o observador a identificar que animais estão próximos ao cio, ou seja, próximos do aceite a monta.

Além da correta observação e identificação dos sinais apresentados pela fêmea em estro, técnicas auxiliares de detecção de cio podem ser empregadas pelo profissional inseminador. Rufiões, que são machos não castrados, com libido normal, submetidos a cirurgias de desvio lateral/aderência peniana ou fêmeas androgenizadas, podem ser usados como uma ferramenta importante para o aumento da eficiência de detecção de estro. Uma ferramenta adicional ao uso de rufiões é o uso de buçal marcador, que é um dispositivo colocado na região da mandíbula do rufião que irá marcar com tinta as fêmeas que eventualmente sofrerem montas pelo macho rufião. O uso de buçal marcador representa grande importância principalmente na diminuição de perdas de cios curtos e (ou) noturnos. Com o avanço das tecnologias, dispositivos eletrônicos também têm sido aplicados no auxílio à detecção de cios. Esses dispositivos identificam principalmente a inquietação de animais que se movimentam acima do normal. Uma terceira técnica auxiliar para identificação de cios seria a sincronização do estro em um grupo de animais. Embora os esforços de observação e identificação de cios ainda sejam necessários quando há a sincronização, a presença de um maior número de fêmeas em estro facilita a observação e a manifestação do estro devido à maior interação entre os animais em cio.

Após a correta detecção de cio, faz-se necessária a inseminação artificial em momento apropriado. O horário de inseminação é definido levando-se em conta os seguintes aspectos: (1) o momento da ovulação após o início do cio (24 a 30 horas); (2) o tempo de sobrevivência do ócito antes que comece a sofrer degeneração (6 a 8 horas); (3) a necessidade de um período de tempo para que haja a capacitação de espermatozoides, afim de que se tornem aptos à fecundação após a IA (6 a 12 horas); e (4) o tempo de sobrevivência dos espermatozoides no

interior do trato genital feminino (cerca de 24 horas) (HAFEZ, 1995). Considerados todos esses fatores, a IA deve ser realizada próximo ao final do estro (cerca de 12 horas após aceitar a monta pela primeira vez; Figura 1). De modo geral, recomenda-se a utilização da regra “am-pm”, na qual, animais observados em cio na parte da manhã são inseminados no final da tarde do mesmo dia, e animais observados em cio na parte da tarde são inseminados no início da manhã do dia seguinte (TRIMBERGER, 1948). Esse método tem sido utilizado com sucesso por várias décadas, o que não impede adaptações do método ao manejo da fazenda em casos específicos.

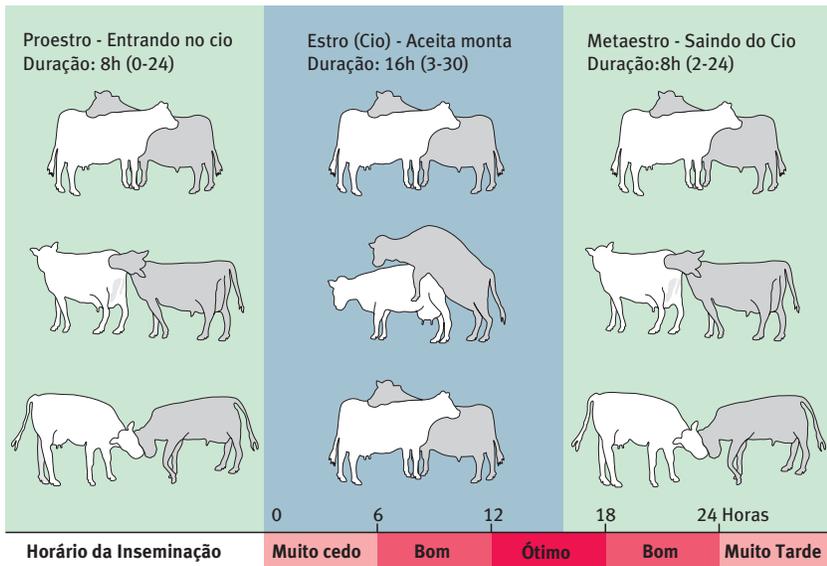


Figura 1. Ilustração dos sinais que auxiliam a detecção de cio durante três fases do ciclo estral bovino (proestro, estro e metaestro); duração média (mín. e máx.) de cada fase; e indicadores do melhor horário para se realizar a Inseminação Artificial.

Fonte: Adaptado de Wattiaux, 2009.

A técnica de IA propriamente dita

A técnica de inseminação artificial em bovinos é relativamente simples de ser executada, o que não diminui a importância de treinamento adequado do profissional responsável. O inseminador é o maior responsável pelo resultado da IA (gestações), visto que está envolvido na maioria das etapas do processo. Um inseminador eficiente é um profissional muito bem treinado e submetido a constantes cursos de reciclagem e capacitação, dedicado, comprometido com os resultados, e necessariamente interessado e motivado pelo serviço que está desempenhando.

A inseminação artificial propriamente dita inicia-se após a detecção de uma fêmea em estro e da definição do momento adequado a inseminá-la. Inicialmente, deve-se avaliar o histórico reprodutivo da fêmea e atentar para o número de dias pós-parto (não inseminar antes de 45 dias pós-parto); número de inseminações anteriores (avaliar se houve excesso de repetições de cio); e verificar se não há gestação confirmada para a matriz (possibilidade de cio falso/cio do encabelamento). O passo seguinte é fazer a retirada de fezes do reto e higienização da região perineal do animal (ao redor do reto e vulva). No momento da retirada de fezes, deve-se observar a característica do muco saindo pela vulva, que deve ter aparência transparente, cristalina. A higienização consiste em lavagem com água abundante para a limpeza de toda a área externa à vulva, seguida de secagem com papel toalha ou um pano limpo.

Terminada a limpeza, o inseminador deve proceder à preparação do material e descongelamento do sêmen. Para isso, deve-se aquecer água limpa até que atinja a temperatura de 35 °C a 37 °C. A temperatura da água para descongelamento do sêmen é de extrema importância para minimizar a morte e lesões de espermatozoides durante o processo de descongelamento (Figura 2). Para descongelamento, abre-se o botijão de nitrogênio líquido e retira-se uma palheta de sêmen com o auxílio de uma pinça de dissecação. A palheta deve ser imersa em água morna (35 °C a 37 °C) por um tempo mínimo de 30 a 50 segundos. A palheta de sêmen deve ser retirada da água e seca com o auxílio de papel toalha, antes que se prossiga a montagem do aplicador de IA. Com o aplicador montado, o inseminador irá introduzir o aplicador na vulva da

fêmea a ser inseminada. Neste momento, é importante a ajuda de uma segunda pessoa, que irá auxiliar na abertura da vulva para que o aplicador não toque o seu exterior. O momento entre a retirada da palheta de sêmen da água morna e a introdução do aplicador pela vulva da fêmea é de extrema importância e deve ser realizado o mais rápido possível. É importante que o sêmen não passe por grandes variações de temperatura, portanto quanto antes o aplicador for colocado no interior da vulva, a uma temperatura constante, melhor. O inseminador então irá segurar o aplicador de IA com uma das mãos e introduzir a outra mão no reto da vaca, manipulando cuidadosamente a cérvix até atingir o início do corpo uterino. O local de deposição do sêmen se localiza 1 cm a 3 cm após o último anel cervical, ou seja, no terço inicial do corpo do útero. O sêmen deve ser lentamente depositado nesse local, o que irá permitir a disponibilidade de espermatozoides para a fecundação em ambos os cornos/tubas uterinas. Encerra-se a técnica de IA com a retirada do aplicador e uma leve massagem no clitóris do animal.

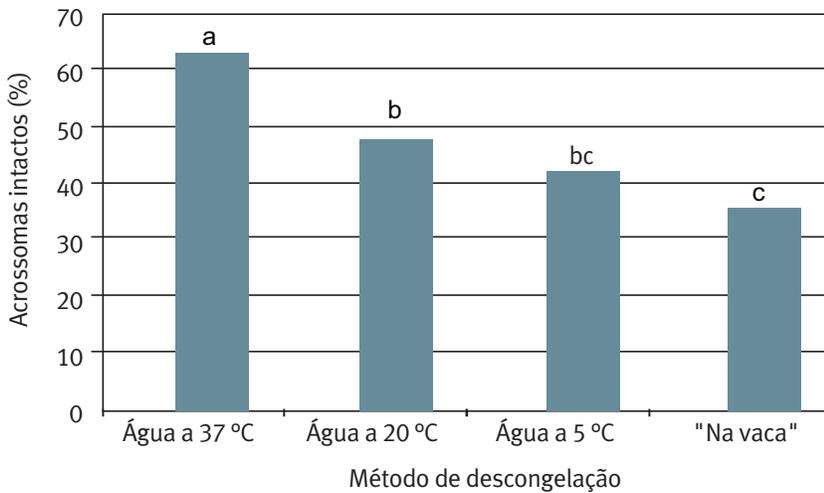


Figura 2. Efeito do método de descongelação na integridade do acrossoma de sêmen bovino criopreservado em palhetas francesas de 0,5 mL. Colunas acompanhadas de letras diferentes (a, b, c), diferiram estatisticamente ($P < 0,05$).

Fonte: Adaptado de De Jarnette et al., 2000.

Inseminação artificial em tempo fixo (IATF)

Considerando que as maiores limitações à difusão da Inseminação Artificial em fazendas são a baixa eficiência de detecção de estros (cio) e a realização da IA no momento correto (LARSON; BALL, 1992), protocolos hormonais que permitem a inseminação artificial em um momento pré-programado (tempo fixo) foram introduzidos como uma alternativa viável e eficiente para contornar esses entraves. Estudos com inseminação artificial em tempo fixo (IATF) foram realizados inicialmente por pesquisadores americanos (PURSLEY et al., 1995) e se difundiram rapidamente, chegando ao Brasil poucos anos depois (BARROS et al., 2000).

Os protocolos hormonais de IATF levam em consideração a fisiologia hormonal e dinâmica ovariana da fêmea bovina, e objetiva sincronizar os principais eventos reprodutivos que ocorrem durante o ciclo estral bovino: (1) início do desenvolvimento folicular; (2) luteólise; e (3) ovulação. O estudo das inter-relações entre os principais hormônios da reprodução (GnRH, FSH, LH, estradiol e progesterona) permitiu a aplicação direta dos conhecimentos adquiridos, e um dos exemplos de aplicações práticas é a IATF/sincronização de ovulação. Os efeitos do GnRH e do estradiol na emergência de uma nova onda folicular e na indução de ovulação; do FSH, no crescimento folicular; do LH, na ovulação; e da prostaglandina $F_2\alpha$, na regressão do corpo lúteo (luteólise) foram, e ainda são, levados em consideração no desenvolvimento de protocolos eficientes para IATF.

Os princípios básicos da IATF são: (1) induzir/sincronizar a emergência de uma nova onda de crescimento folicular pela aplicação exógena de estradiol ou GnRH (ou seus análogos); (2) induzir luteólise, interrompendo a fase luteal, por meio da aplicação de prostaglandina $F_2\alpha$; e (3) induzir a ovulação pela aplicação de GnRH, LH ou estradiol (PURSLEY et al., 1995; BARROS, 2000). A exposição à progesterona durante a fase de desenvolvimento folicular resulta em melhores taxas de gestação após o protocolo e, por essa razão, fontes de progesterona exógena (dispositivos intravaginais ou auriculares) foram incorporadas aos protocolos (MAPLETOFT et al., 2003). Uma representação esquemática dos princípios para definição de um protocolo de IATF é apresentada na Figura 3.

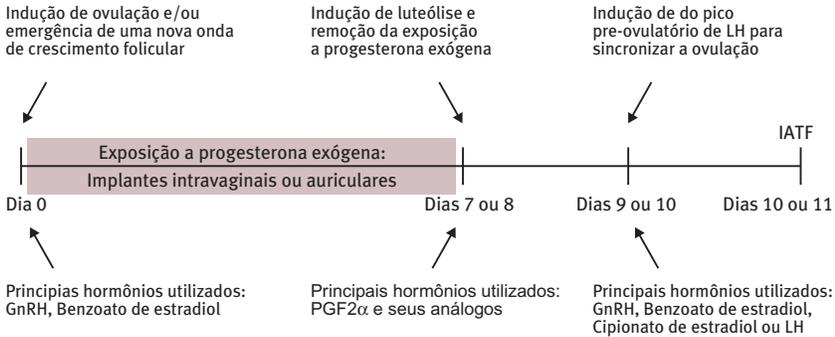


Figura 3. Representação esquemática dos princípios básicos de protocolos de sincronização de ciclos/ovulação para permitir Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF).

Estudos têm sido conduzidos no intuito de investigar os efeitos de alguns hormônios adicionais ao protocolo básico de IATF na indução de ciclicidade em vacas em anestro pós-parto. Os principais hormônios que têm sido adicionados ao protocolo são à base de FSH (FSH-V ou FSHp) ou hormônios que mimetizam seus efeitos (gonadotrofina coriônica equina, eCG; ERENO et al., 2007). Os objetivos são induzir o crescimento folicular com o auxílio de gonadotrofinas exógenas, a fim de que o folículo ovulatório alcance um tamanho tal que induza a onda pré-ovulatória de LH, vencendo os bloqueios a hormônios da reprodução (p.ex., o LH) típicos da fase pós-parto, resultantes, por exemplo, da amamentação de bezerras. Adequada condição corporal no pós-parto, contudo, ainda é um pré-requisito importante para que se obtenham resultados satisfatórios em termos de taxa de gestação (BÓ et al., 2003). É importante salientar que protocolos hormonais não substituem cuidados com a alimentação e um correto manejo nutricional das matrizes a serem inseminadas. Dessa forma, o uso de protocolos de IATF em animais subnutridos e (ou) com baixa condição corporal provavelmente incorrerá em resultados insatisfatórios.

Trasferência de embriões

A finalidade básica da Transferência de embriões (TE) em bovinos é a multiplicação, de forma acelerada, do material genético de uma

doadora superior. Especificamente, procura-se aumentar o número de descendentes de uma determinada fêmea, aproveitando o seu potencial genético para produção. Resumidamente, assim como a Inseminação Artificial potencializa o uso de material genético de touros superiores, a TE difunde material genético de fêmeas superiores. A transferência de embriões, assim como a IA, também se tornou um grande nicho de mercado e opera em níveis comerciais atualmente no Brasil. Além do viés comercial, a TE fornece conhecimentos básicos de desenvolvimento embrionário inicial que podem ser aplicados em outras biotecnologias da reprodução.

Datam do final do século XIX os primeiros relatos de sucesso em transferência de embriões, em coelhos (HEAPE, 1891; citado por BETTERIDGE, 2003; HASLER, 2003). Em bovinos, contudo, somente em meados do século XX (1950) foi registrado o nascimento do primeiro bezerro fruto de transferência de embriões (WILLETT et al., 1951). O uso da técnica de TE em escala comercial começou modestamente no início da década de 1970, limitada por questões práticas (coleta e transferência cirúrgicas, com a doadora sob anestesia geral). Com a introdução dos métodos de coleta e transferência não cirúrgicas e a disponibilidade de prostaglandina $F_2\alpha$ para sincronizar doadoras e receptoras, a TE se tornou mais prática e pôde ser realizada na própria fazenda, o que aumentou bastante o potencial de difusão da técnica (HASLER, 2003).

Dados atuais registram cerca de 823.160 embriões transferidos no mercado mundial de TE em bovinos (THIBIER, 2008). No cenário nacional, o Brasil é o segundo maior produtor de embriões *in vivo* fora da América do Norte e Europa e se consolidou como o maior produtor mundial de embriões *in vitro*, respondendo por quase 80% das transferências desses embriões em 2007 (THIBIER, 2008).

Entre as principais aplicações da TE, destacam-se: (1) planejamento de acasalamentos e multiplicação de animais de genótipo superior; (2) otimização de programas de seleção e melhoramento genético; (3) conservação de recursos genéticos (animais raros ou em risco de extinção); (4) controle de doenças no comércio de material genético; (5) importação e exportação de material genético a menor custo e com

menor risco sanitário; e (6) fornece a base para adoção de outras biotecnologias.

A TE em bovinos se caracteriza por três etapas principais: (1) indução da superovulação; (2) coleta, identificação e classificação dos embriões; e (3) transferência ou congelamento dos embriões.

Superovulação de doadoras

A primeira etapa da TE diz respeito à seleção de doadoras. Nesse sentido, avalia-se o genótipo, o fenótipo, a progênie (quando disponível), aspectos sanitários do animal, o histórico reprodutivo e ainda é realizado um exame ginecológico completo visando a identificação de eventuais patologias ou qualquer outra condição de restrição. A superovulação de doadoras de embriões tem a finalidade de induzir o crescimento e a consequente ovulação de vários folículos em uma espécie monovulatória (bovinos). Os protocolos de superovulação (SOV) são baseados em conhecimentos da fisiologia reprodutiva dos bovinos, especificamente dinâmica do crescimento de folículos ovarianos e endocrinologia do ciclo estral. É importante que se tenha em mente alguns aspectos básicos de fisiologia da reprodução, como por exemplo, a ocorrência de, na grande maioria dos animais, duas ou três ondas de crescimento folicular durante um ciclo estral. A emergência de cada onda é precedida por uma elevação nas concentrações de FSH, o que causa o desenvolvimento de um pool de folículos pequenos (3 mm a 4 mm em diâmetro), que irão crescer simultaneamente até que se estabeleça o processo de divergência e dominância folicular. O folículo dominante passará a crescer a taxas maiores do que os chamados subordinados e exercerá um efeito negativo sobre eles, causando sua atresia. O folículo dominante se torna ovulatório, pois produz estradiol a concentrações suficientes para induzir a ovulação, caso não haja o bloqueio da progesterona produzida pelo corpo lúteo (após a ocorrência de luteólise; proestro). Havendo alta progesterona (diestro), o folículo dominante irá iniciar sua regressão (atresia), haverá uma elevação no FSH circulante e uma nova onda de crescimento folicular irá emergir (Figura 4) (GINTHER et al., 1996).

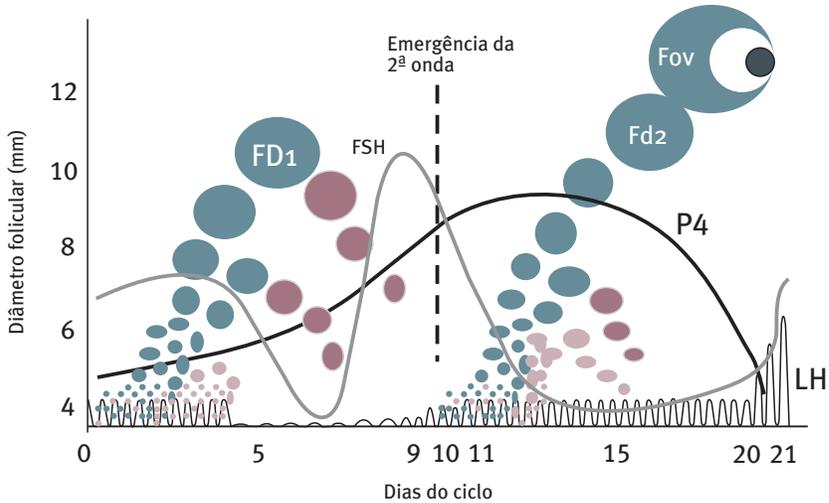


Figura 4. Representação esquemática da dinâmica folicular na vaca, em um ciclo caracterizado por duas ondas de crescimento folicular. O folículo dominante da primeira onda (FD1) cresce em ambiente com alta progesterona, o que impede a ovulação. Já o folículo dominante da segunda onda (FD2) se torna ovulatório (Fov) após a redução na concentração de progesterona causada pela lise do corpo lúteo (CL) que, em geral, se inicia após o 16º-18º dia do ciclo estral. As curvas representam concentrações plasmáticas usuais de hormônio folículo-estimulante (FSH), progesterona (P4) e hormônio luteinizante (LH).

O tratamento superovulatório deve ser iniciado no momento em que há um maior número de folículos aptos a responder ao tratamento, ou seja, um maior número de folículos pequenos (3 mm a 4 mm) em crescimento (MAPLETOFT et al., 2002). Considerando-se o ciclo estral da vaca, de maneira geral, é recomendado o início do tratamento por volta do 9º-10º dia do ciclo, que coincide com o dia de emergência da segunda onda de crescimento folicular (GINTHER et al., 1989). Neste momento, o folículo dominante da primeira onda já está afuncional e em regressão, e há um pool de folículos crescendo, aptos a responder ao tratamento. A ausência de um folículo dominante funcional durante a SOV resulta em maior número de folículos ovulatórios e maior número de embriões coletados (BUNGARTZ;

NIEMANN, 1993). Inicialmente, a superovulação era induzida por meio de tratamentos a base de gonadotrofina coriônica equina (eCG), um hormônio que possui ação folículo estimulante (MONNIAUX et al., 1983). No entanto, quando preparações a base de FSH se tornaram disponíveis comercialmente (principalmente de origem suína), esse tipo de produto passou a ser utilizado em grande número de tratamentos superovulatórios (MONNIAUX et al., 1983).

Atualmente, o protocolo básico para indução da superovulação em bovinos consiste de seis a oito aplicações de produtos a base de FSH a intervalos de 12 horas, durante três a quatro dias, em esquema de doses decrescentes, ou seja, 40% da dose total no primeiro dia; 30% no segundo dia; 20% no terceiro; e os 10% restantes no último dia de tratamento (Figura 5) (MONNIAUX et al., 1983). Dentro do protocolo, há ainda tratamentos (uma ou duas injeções) com prostaglandina $F_2\alpha$, para que se cause a lise do corpo lúteo presente e permita-se à doadora manifestar cio e ovulação. Em geral, um ou dois dias após o término da SOV, a doadora de embriões irá apresentar cio e deverá ser inseminada artificialmente (12 e 24 horas após o início do estro). Obviamente, este protocolo pode ser adaptado e (ou) modificado, mas deve-se sempre respeitar os eventos que ocorrem em níveis ovarianos e endócrinos durante o ciclo estral da vaca.

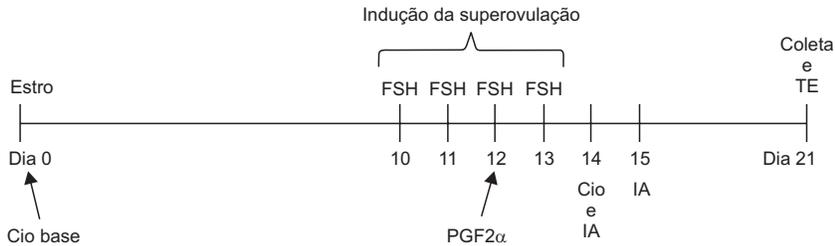


Figura 5. Ilustração do protocolo básico de indução da superovulação em bovinos, com base em observação de cio (Dia 0); estimulação com FSH exógeno a partir da emergência da segunda onda de crescimento folicular (Dia 10); indução de luteólise com prostaglandina $F_2\alpha$ (PGF 2α); e coleta de embriões sete dias após o estro e IA.

Sincronização de doadoras e receptoras

O resultado positivo da transferência de embriões (gestação) depende, entre outros fatores, do grau de sincronia entre doadora e receptora. O embrião recém transplantado ao útero de uma receptora precisa encontrar um ambiente fisiologicamente compatível, em termos endócrinos e de secreção, com a sua idade (sete dias) para que continue o seu desenvolvimento normal. Melhores taxas de gestação são encontradas quando há uma sincronia de ± 24 horas entre o cio da doadora e da receptora (HASLER et al., 1987), sendo por isso recomendada a utilização de receptoras no $D7 \pm 1$ do ciclo estral ($D0 =$ estro), levando-se em conta que a doadora se encontra no D7.

Os métodos de sincronização de cios são bastante conhecidos e variados, podendo ser utilizados progestágenos para prolongamento da fase luteal, prostaglandina $F_2\alpha$ e seus análogos para indução de luteólise e redução da fase luteal, ou sincronização da onda de crescimento folicular pela aplicação de estradiol ou GnRH.

Há diferentes formas comerciais de progestágenos, sendo as principais os implantes auriculares e os dispositivos intravaginais. Seu uso na sincronização apresenta as vantagens de não ser dependente da fase do ciclo estral e possibilitar maior flexibilidade na programação. Desvantagens desse método incluem custo elevado e traumas (irritação vaginal ou implante auricular). Já o uso de prostaglandina $F_2\alpha$ tem baixo custo, maior praticidade e apresenta ainda a vantagem de os produtos comerciais estarem amplamente disponíveis em lojas. No entanto, a eficiência de sincronização após a aplicação de $PGF_2\alpha$ é limitada, pois a luteólise induzida só irá ocorrer durante a fase de diestro (dias 6 a 15 do ciclo estral), quando o CL tem sensibilidade ao produto. Uma segunda limitação diz respeito ao grau de sincronização dos animais, visto que há diferenças de tempo entre a aplicação de $PGF_2\alpha$ e a manifestação de estro, que pode ocorrer tão cedo quanto 48 horas e tão tarde quanto 96 horas após o tratamento. Esses distintos intervalos $PGF_2\alpha$ -Estro existem em razão do estágio de desenvolvimento do folículo dominante no momento do tratamento, o qual ainda necessita de crescimento e maturação até que ocorra a ovulação (KASTELIC et al., 1990).

Atualmente, assim como na inseminação artificial, é possível na TE a sincronização da emergência da onda de crescimento folicular e subsequente indução da ovulação, permitindo assim a indução de superovulação e coleta de embriões em momento pré-determinado (tempo fixo; SOVTF) e também a transferência de embriões em tempo fixo (TETF) para receptoras com ovulação sincronizada (BÓ et al., 2002). Os princípios de SOVTF e TETF são semelhantes aos da IATF, dizendo respeito basicamente: (1) sincronização da onda folicular por indução da ovulação ou atresia do folículo dominante pela aplicação de preparações a base de estradiol ou GnRH, associados à progesterona exógena; (2) superovulação com tratamento a base de FSH (SOVTF); (3) indução da ovulação dos vários folículos ovarianos (SOVTF) ou do folículo dominante (TETF) pela aplicação de preparações a base de estradiol, GnRH ou LH; e (4) IA em tempo fixo (SOVTF) ou transferência de embriões sete dias após o estro induzido (TETF). Os protocolos de SOVTF e TETF são ferramentas bastante úteis quando há a necessidade de programação das coletas e transferências. Ainda, protocolos de TETF podem ser essenciais em locais onde há carência de mão de obra treinada para observação de cio em receptoras.

Procedimentos de coleta e transferência de embriões

Após a indução da superovulação e inseminação artificial da doadora, faz-se necessário a coleta de embriões. Devido ao desenvolvimento embrionário inicial em bovinos, em geral, coleta-se os embriões entre seis e oito dias após o estro (Dias 6, 7 e 8 do ciclo estral) quando os embriões já se deslocaram das tubas uterinas em direção ao lúmen uterino e se encontram na fase de mórula ou blastocisto (SENGER, 2005). A programação da coleta inicia-se com a escolha e organização do material de coleta. Nesse momento é importante a existência de uma listagem de todo o material necessário (*check list*), principalmente se a coleta for feita na fazenda. Com o material organizado e separado, inicia-se a preparação da doadora (o que inclui a retirada de fezes do reto, limpeza e higienização da região perineal e anestesia epidural – em animais bravios, pode ser necessária uma leve sedação para tranquilizar o animal), que, depois de higienizada e anestesiada, segue para a coleta em si.

O processo de coleta é iniciado com a passagem de um cateter de Foley pela cérvix e posicionamento no corpo do útero ou na entrada de um dos cornos. Em seguida, um pequeno balão é inflado na extremidade do cateter para que não haja retorno de líquido e inicia-se a lavagem dos cornos uterinos (*flushing*) com meio apropriado (solução salino-fosfato tamponada, PBS), utilizando-se um circuito de coleta em forma de Y para que haja entrada e o retorno da solução. O conteúdo do lavado uterino é direcionado diretamente para um filtro coletor de embriões, que irá filtrar o excesso de líquido e não permitir a passagem de possíveis embriões. Ao final da coleta, o filtro, contendo pequena quantidade de líquido e as prováveis estruturas embrionárias coletadas, é levado ao laboratório, lavado com solução PBS, e o seu conteúdo colocado em placas de Petri para rastreamento, identificação e manipulação dos embriões recuperados. Os embriões são então classificados por grau de qualidade (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998), transferidos para meio de manutenção (“holding”). Nesse momento decide-se quanto à transferência ou criopreservação dos embriões coletados. No caso de criopreservação, os embriões são transferidos para placas de Petri contendo uma solução crioprotetora (por exemplo, etilenoglicol ou glicerol), envasados em palhetas de 0,25 mL, e é então iniciado o processo de congelamento. No caso de transferência a fresco, os embriões em meio de manutenção são envasados diretamente para palhetas de 0,25 mL para que possam ser transferidos para receptoras.

A próxima etapa inclui a seleção de receptoras e a transferência de embriões propriamente dita. A seleção de receptoras é uma etapa extremamente importante no processo de TE, pois influencia diretamente os resultados em termos de taxa de gestação (STROUD; HASLER, 2006). Receptoras de embrião devem estar sob excelente manejo nutricional (bom escore de condição corporal), sanitário (livre de doenças) e reprodutivo (ausência de patologias), ou seja, devem ser manejadas com a mesma atenção oferecida às doadoras (STROUD; HASLER, 2006). A condição *sine qua non* para uma receptora ser considerada apta a receber um embrião é estar em sincronia com o ciclo estral da doadora (Dia 7 ± 1) e apresentar um corpo lúteo (CL) funcional no momento da transferência (JONES; LAMB, 2008). Nesse con-

texto, além da avaliação visual da aparência externa do animal, se faz necessário um exame do aparelho reprodutivo (útero e ovários) com o intuito de identificar a existência de qualquer anormalidade uterina (p. ex. infecção) e também identificar e localizar o corpo lúteo (ovário direito ou esquerdo). O uso de ultra-sonografia na seleção de receptoras pode ser encarado como uma ferramenta adicional para auxiliar a tomada de decisão, mas não é condição essencial. Alguns estudos indicaram que, desde que a receptora tenha apresentado estro em sincronia com a doadora e apresente um corpo lúteo palpável no Dia 7, ela está apta a receber um embrião, independente da qualidade ultrassonográfica do CL e de concentrações plasmáticas de progesterona (SPELL et al., 2001).

A transferência dos embriões para receptoras aptas pode ser feita pelo método cirúrgico ou não cirúrgico, o mais utilizado. O método não cirúrgico é realizado sob leve anestesia epidural, por via transcervical, com o auxílio de um aplicador de TE (inovulador). O embrião deve ser transferido no terço final do corno uterino ipsilateral ao ovário contendo o corpo lúteo. O diagnóstico de gestação pode ser feito precocemente (aos 28-30 dias de gestação; i.e., 21-23 dias após a TE) por meio de ultrassonografia ou por palpação retal após os 45 dias de gestação.

Realidades e limitações da TE

Dados mundiais de coletas de embriões indicam um número médio de embriões viáveis por coleta de 6,22; considerando dados de 122 mil coletas. Analisando-se os dados dos diferentes continentes, a variação é de 5,1 a 7,6 embriões viáveis/coleta (THIBIER, 2008). Esses dados representam uma das grandes limitações da TE, pois a média não reflete a realidade, em que são observadas respostas excelentes (25-30 embriões viáveis) e respostas sofríveis (nenhum embrião coletado). Essa grande variação na resposta pode ser explicada por alguns fatores: (1) diferenças no tratamento superovulatório (preparação hormonal, duração e momento do tratamento); (2) fatores inerentes ao animal doador (variação individual na reserva de folículos ovarianos e, conseqüentemente, na população de folículos disponíveis para recrutamento; o status ovariano no início do tratamento; e resposta ao FSH

exógeno); (3) fatores inerentes ao ambiente e história do animal (condição nutricional, histórico reprodutivo, repetidas superovulações, idade e raça); e (4) erros no procedimento de coleta e preparação das doadoras (MAPLETOFT et al., 2002).

Apesar dos grandes avanços em tecnologia, a média de embriões viáveis/coleta pouco variou nas últimas décadas, como demonstrado por um estudo com 1.733 doadoras, que foram coletadas nos anos de 1979 ou 1999 (HASLER, 2003). Em um programa de TE, aproximadamente 1/3 (25% a 35%) das doadoras não responderão ao tratamento (sem produção de embriões); 50% a 60% terão respostas ruins ou intermediárias; e apenas um número reduzido de doadoras terá respostas acima da média, ou seja, boas ou excelentes. Ainda, cerca de 30% das doadoras produzirão a maioria (~70%) dos embriões (DONALDSON, 1984; MAPLETOFT et al., 2002).

Quando se inicia um programa de transferência de embriões, seja ele de caráter comercial ou não, deve-se ter em mente que para o sucesso da manipulação hormonal do crescimento de folículos ovarianos é necessário um bom conhecimento da fisiologia reprodutiva e endocrinologia da fêmea bovina. Além disso, é importante saber que a técnica de TE apresenta limitações inerentes à fisiologia das doadoras (variação individual) e que a técnica é caracterizada por grande variância nos resultados. Embora um grande progresso tenha sido feito em fisiologia da reprodução dos bovinos, fatores inerentes à doadora que afetam a resposta superovulatória são apenas parcialmente entendidos.

Produção in vitro de embriões

A inseminação artificial (IA) em bovinos foi o primeiro passo para acelerar a transferência de características desejáveis, permitindo a disseminação de genes de machos considerados superiores e a melhoria do nível zootécnico dos rebanhos. Um reprodutor bovino pode produzir milhares de bezerros durante sua vida produtiva pela IA, enquanto que no mesmo período, uma fêmea não é capaz de produzir mais do que 8 a 10 bezerros. Portanto, o possível ganho genético obtido pela linhagem materna era extremamente limitado. Com o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida em animais, ocorreu um

grande avanço na otimização e multiplicação de fêmeas de interesse não só para a produção animal, mas também para a conservação e regeneração de espécies animais em perigo de extinção.

A transferência de embriões (TE) proporciona um melhor aproveitamento de matrizes de elevado mérito genético, podendo aumentar, em média, 10 vezes o número de crias/ano. Com o advento da produção *in vitro* de embriões (PIV) esse potencial de multiplicação se torna ainda maior, pois aumenta consideravelmente, o número de produtos/vaca/ano. Além disso, essa técnica também abre a possibilidade de utilizar bezerras pré-púberes, vacas em início de gestação, vacas com subfertilidade adquirida e vacas senis.

Embriões produzidos *in vitro* são aqueles produzidos pela manipulação de gametas, fora de organismo materno. Essa técnica, inicialmente, se resumia a fecundação *in vitro* (FIV), entretanto, após o nascimento do primeiro bezerro em 1981 (BRACKETT et al., 1982), avanços consideráveis foram obtidos. Atualmente, essa tecnologia se refere à combinação de vários processos interdependentes, que vão desde a obtenção dos oócitos imaturos à transferência dos embriões para as fêmeas receptoras que levarão a gestação a termo.

Obtenção de oócitos imaturos para PIV

Oócitos bovinos imaturos juntamente com as células do *cumulus* que o rodeiam, complexo *cumulus*-oócito (COC), podem ser recuperados dos ovários *in vitro* – quando se utiliza ovários provenientes de abatedouros ou de animais mortos – e *in vivo*, que pode ser realizada cirurgicamente ou por ultrassonografia transvaginal (OPU).

A recuperação *in vitro* de COC pode ser realizada por dissecação ou fatiamento dos ovários ou aspiração dos folículos ovarianos. A dissecação permite o isolamento mecânico de folículos individualmente, sendo um processo trabalhoso e demorado. O fatiamento dos ovários proporciona um maior número de estruturas recuperadas e, é importante quando se trabalha com ovários isolados de vacas de elevado mérito genético. Nesse caso, além da punção dos folículos visíveis na superfície do ovário, é feita a dissecação desses ovários maximizando o seu aproveitamento. A aspiração é método mais eficiente

e mais utilizado, e pode ser realizada com uma seringa ou com uma agulha acoplada a uma bomba a vácuo, com a qual se aspiram todos os folículos presentes na superfície dos ovários cujas medidas variem entre 2 mm e 8 mm de diâmetro (GORDON, 2003). A quantidade e qualidade dos COCs recuperados são influenciadas por vários fatores, tais como: época do ano; estado fisiológico do animal; tamanho do folículo aspirado (DODE et al., 2001); raça e idade das doadoras.

A recuperação de COCs *in vivo* pode ser realizada cirurgicamente, quando animais muito jovens são utilizados, ou por OPU, em que a obtenção de oócitos é feita pela punção folicular com uma agulha acoplada a uma sonda transvaginal, de forma que, os folículos a serem puncionados são visualizados na tela do ultrassom. A aspiração dos folículos é realizada com auxílio de uma bomba a vácuo, sendo os COCs, juntamente com o líquido folicular, transportados por um sistema de cânulas ao tubo coletor. A média de oócitos obtidos também varia com a raça, a idade, o estágio fisiológica da doadora e a estratégia de punção adotada. É possível puncionar os folículos de uma doadora duas vezes por semana, uma vez por semana ou uma vez a cada duas semanas, sendo as duas últimas alternativas possíveis de dobrar os resultados mediante a estimulação hormonal (GOODHAND et al., 1999). Independente da estratégia, o resultado final esperado é de pelo menos uma gestação por semana por doadora (PEIXER et al., 1996; BOUSQUET et al., 2000).

Independente do procedimento utilizado, aspiração *in vivo* ou *in vitro*, os COCs coletados juntamente com o líquido folicular são depositados em um tubo estéril, que se deixa decantar por em torno de 10 minutos. Após esse período, o decantado é transferido para uma placa de Petri, em que será realizada a busca e seleção dos oócitos.

Seleção de oócitos

Após a recuperação, COCs devem ser classificados, utilizando como critério a homogeneidade e coloração do citoplasma e aparência, compactação e número de camadas de células do *cumulus*. Essa morfologia dos COCs tem sido utilizada como método de seleção visual por ter sido correlacionada com as taxas de blastocistos. Existem vários

sistemas para avaliação da morfologia de oócitos, tais como o sistema de Stojkovic et al. (2001) descrito abaixo:

- **Qualidade 1:** Complexo cumulus oócito com citoplasma homogêneo e com granulações finas e múltiplas camadas compactas de células do cumulus.
- **Qualidade 2:** Oócito com citoplasma homogêneo com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares, Cumulus compacto menor do que na categoria 1 com pelo menos 5 camadas completas.
- **Qualidade 3:** Oócito com citoplasma heterogêneo/vacuolizado, a zona pelúcida coberta com pelo menos 3 camadas de células do cumulus e (ou) com pequenas áreas desnudas.
- **Qualidade 4:** Citoplasma heterogeneamente pigmentado e o cumulus completamente/parcialmente ausente ou expandido.

Maturação *in vitro* de oócitos

Durante a ovogênese, os oócitos de mamíferos permanecem retidos no estágio de diplóteno da prófase da primeira divisão meiótica, desde a vida fetal até pouco antes da ovulação. A retomada da meiose pode ser mediada por um estímulo hormonal *in vivo*, ou pela retirada do oócito de dentro do folículo (WASSARMAN; ALBERTINI, 1994). Portanto, quando os oócitos são aspirados dos folículos ovarianos (normalmente entre 2 mm a 6 mm de diâmetro) para serem utilizados na PIV, eles ainda são imaturos e necessitam sofrer o processo de maturação *in vitro* (MIV), que é realizada cultivando os oócitos, logo após a aspiração do folículo e seleção dos COCs, em meio de maturação, com temperatura e atmosfera apropriada, por um período de 22 a 24 horas.

A maturação envolve mudanças nucleares e citoplasmáticas que devem ocorrer simultaneamente e que conferem aos oócitos a capacidade de serem fecundados, descondensarem a cabeça do espermatozóide, formarem os pró-núcleos e terem desenvolvimento embrionário normal (DODE et al., 2000a).

Os eventos nucleares envolvem reorganização da rede de microtúbulos, rompimento do envoltório nuclear, condensação dos cromossomos e progressão para metáfase I, anáfase I, telófase I, expulsão do primeiro corpúsculo polar e retenção no estágio de metáfase II (CHA; CHIAN, 1998).

No que se refere ao citoplasma, ocorre reprogramação na síntese protéica, mudança na atividade da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e do fator promotor da maturação (MPF), desenvolvimento dos mecanismos de liberação de Ca^{++} , e aquisição da capacidade de descondensar a cabeça do espermatozóide (SALAMONE et al., 2001). Ainda durante esse período, ocorrem mudanças na organização citoplasmática, tais como: um contínuo desenvolvimento dos estoques de lipídios; redução do aparelho de Golgi; redistribuição de ribossomos; rearranjo das mitocôndrias; e alinhamento dos grânulos corticais próximos à membrana plasmática (DIELEMAN et al., 2002). O aumento no estoque de lipídios pode estar associado com a formação de um pool de energia essencial para o oócito suportar o desenvolvimento após a fecundação.

Outro evento que ocorre na maturação é a expansão das células do cumulus, que circundam os oócitos. Essas são células da granulosa especializadas que estão metabolicamente associadas entre si e com o oócito. No oócito imaturo, elas estão muito compactadas e durante a maturação iniciam a secreção de ácido hialurônico que se deposita entre elas, separando-as e causando a expansão dessas células.

Fecundação *in vitro*

Para a fecundação *in vitro*, espermatozoides e oócitos maduros são co-incubados, em um meio específico, por um período em torno de 18 horas, sendo possível co-incubar por períodos menores sem afetar as taxas de produção de embriões (DODE et al., 2002a).

Para que a FIV ocorra com sucesso, é necessário que os oócitos tenham sofrido uma maturação completa e que os espermatozoides tenham sido adequadamente preparados.

Para a preparação do sêmen a ser utilizado na FIV, vários métodos para remover o plasma seminal e (ou) crioprotetor e melhorar as características seminais tem sido descritos. Entre eles, pode-se citar a lavagem por centrifugação; gradientes de densidade; filtragem em coluna de fibra de vidro; e migração ascendente. Os mais utilizados são gradiente de densidade utilizando *percoll*, e a migração ascendente conhecida por *swim-up*.

No *Swim-up* o sêmen é depositado no fundo de um tubo contendo meio de preparação de sêmen e deixado em repouso por aproximadamente 60 minutos. Os espermatozóides vivos migram por motilidade ascendente para a porção superior do meio, os espermatozóides mortos, diluidor e demais constituintes do sêmen permanecem no fundo do tubo. A porção superior é recuperada e utilizada para a FIV.

No gradiente de *percoll*, os espermatozóides também são selecionados pela motilidade através da passagem por diferentes gradientes. Para separação espermática se utiliza duas concentrações, que em geral são de 45% e 90%, depositadas em um tubo sendo o sêmen colocado na superfície do gradiente. Após centrifugação, o sobrenadante é retirado e o pellet é lavado e utilizado para a FIV.

Além da qualidade dos oócitos, do método utilizado para preparação do sêmen e do tempo de co-incubação, outros fatores podem afetar a taxa de fecundação, tais como: a dose inseminante; a interação touro-vaca; e a diferença entre touros na capacidade de fecundar e produzir embriões, sendo a variação individual de touros um dos principais fatores que interferem produção comercial de embriões PIV.

Cultivo de embriões produzidos *in vitro*

Após a fecundação *in vitro*, os embriões são transferidos para o cultivo embrionário onde permanecem por um período de sete dias, até atingirem o estágio de blastocisto, quando então podem ser transferido para o útero de fêmeas receptoras que levarão a gestação a termo.

O cultivo *in vitro* de embriões requer um sistema que suporte o desenvolvimento embrionário. Vários sistemas de cultivo foram desenvolvidos e utilizados. Esses sistemas incluem o cultivo em oviduto de hospedeiro intermediário, co-cultivo com vários tipos de células somáticas e cultivo livre de células somáticas.

Cultivo *in vivo* em oviduto de coelhas ou ovelhas até o estágio de blastocisto foi inicialmente muito utilizado, mas caiu em desuso após o desenvolvimento dos sistemas de co-cultivo. Apesar de esse método requerer procedimento cirúrgico e ser oneroso, ainda é utilizado por alguns grupos de pesquisa (LONERGAN et al., 2006; GALLI et al., 2003).

O co-cultivo com células somáticas tornou possível o cultivo totalmente *in vitro* de embriões PIV. Sendo que vários tipos de células somáticas tais como da granulosa, epiteliais de oviduto, uterinas e células de linhagem estabelecidas para cultivo como células VERO e células BRL (*Buffalo rat Liver Cells*) podem ser utilizadas.

Entretanto, com o desenvolvimento do meio SOF, que foi criado baseado na constituição do fluido do oviduto de bovinos, foi eliminada a necessidade de co-cultivo (WATSON, 2000). Esse meio, contudo, requer uma atmosfera de 5% de O_2 , a qual difere da utilizada para a MIV e FIV. Estudos têm demonstrado que o meio SOF também pode ser utilizado com alta tensão de O_2 sem afetar o desenvolvimento embrionário, desde que as células do cumulus remanescentes no zigoto após a FIV sejam mantidas (CORRÊA et al., 2008).

Diferença entre os embriões *in vivo* e *in vitro*

Embriões produzidos *in vitro* e os produzidos *in vivo* diferem em várias características, tais como: aspectos morfológicos e metabólicos; alterações cromossômicas; número de células; e expressão de RNAm específicos, assim como, uma maior sensibilidade a criopreservação (VAN SOOM et al. 1996; VIUFF et al., 1999; BERTOLINI et al., 2002). Essas diferenças, possivelmente determinam o começo de uma série de problemas que levam uma redução na eficiência da técnica (FARIN et al., 2001).

Os embriões PIV apresentam maior vacuolização, menor número de células, menor densidade de mitocôndrias, maior densidade de lipídios (CROSIER et al., 2001) e junções incompletas entre as células do botão embrionário e trofoblasto (FARIN et al., 2001). Em estudos utilizando a técnica de FISH para avaliar poliploidias, foi determinado que 72% dos embriões produzidos *in vitro* eram mixoplóides e que – apesar de a mixopolidia ocorrer também em embriões *in vivo* – nos *in vitro*, ocorre com maior frequência e em estágios mais precoces de desenvolvimento (VIUFF et al., 1999).

Na PIV cerca de 30% a 50% dos oócitos inseminados chegam ao estágio de blastocisto e os índices de gestação estão em torno de 40% (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, 2006). As maiores perdas no desenvolvimento embrionário ocorrem nos estágios de 8 para 16 células (ativação do genoma do embrião) e pós-transferência, em torno dos dias 14 e 15 da gestação.

Aplicações da PIV

A utilização comercial dessa técnica ainda está limitada ao custo, e vai depender do balanço entre o mérito genético do produto (bezerro) e o custo de sua produção. Entretanto, apesar do custo ainda ser alto, a PIV está sendo gradualmente integrada a programas de melhoria genética, como uma ferramenta complementar para multiplicação animal.

Em termos práticos, o potencial da PIV fica mais evidente quando se discute suas diferentes aplicações. À medida que o sistema PIV melhora, novas alternativas surgem como a criopreservação do oócito e do embrião para formação de bancos de germoplasma comercial ou para preservação de espécies. No entanto, os maiores impactos da PIV para a produção animal são: expansão genética rápida pelo aumento do número de produtos provenientes de fêmeas geneticamente superiores; produção de embriões de vacas com subfertilidade adquirida, vacas em início de gestação e vacas senis, bem como, bezerras pré-púberes; possibilidade de se estabelecer “fábricas” de embriões com grau de sangue definido segundo o ecossistema e sistema de produção; e sua aplicação associada à sexagem de espermatozoides produzindo várias gestações com apenas uma dose inseminante sexada.

Considerações sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos

Apesar dos avanços observados nessa área nos últimos anos, vários aspectos precisam ser ainda esclarecidos. As questões estão associadas à avaliação da competência biológica dos gametas e ao próprio sistema de cultivo. Estudos básicos sobre os diversos mecanismos envolvidos estão sendo conduzidos a nível mundial. Os resultados desses estudos esclarecerão os aspectos relativos à maior susceptibilidade dos embriões PIV à criopreservação, a menor viabilidade dos oócitos de bezerras quando comparados aos de vacas e as baixas taxas de prenhez devido à menor qualidade desses embriões.

É importante salientar que, por se tratar de uma técnica relativamente nova, o monitoramento rigoroso das doadoras de oócitos, dos oócitos, dos embriões e dos produtos nascidos é de fundamental importância para que essa técnica possa ser utilizada com segurança, de forma adequada e nas situações mais indicadas.

Transferência nuclear (clonagem animal)

A transferência nuclear ou clonagem com célula somática é uma técnica em que o núcleo (DNA) da célula é transferido para dentro de um oócito em fase de metáfase II, com o objetivo de gerar um novo indivíduo, geneticamente idêntico ao animal doador da célula somática (TIAN et al., 2003)(Figura 6).

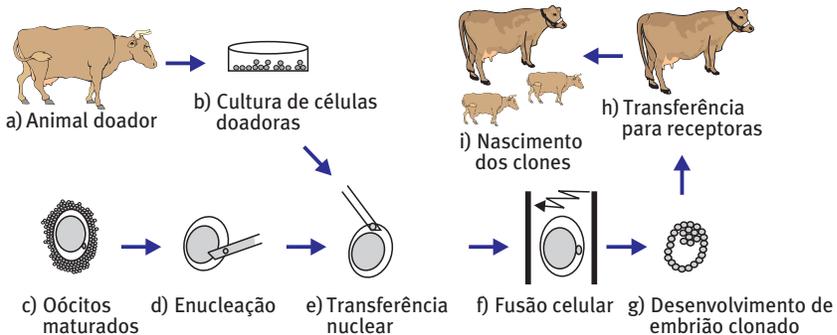


Figura 6. Representação esquemática do processo de transferência nuclear. As células são coletadas do animal doador (a) e cultivadas *in vitro* (b). Um oócito maturado em metáfase II (c) é então tem seu núcleo retirado (enucleado) (d) e a célula somática do animal doador é transferida para o interior do oócito enucleado (e). A célula somática e o oócito são fusionados (f) e os embriões se desenvolvem *in vitro* até a fase de blastocisto (g). Os blastocistos podem então ser transferidos para uma fêmea receptora e os animais clonados nascem após completarem o período de gestação (i).

Fonte: Adaptado de Tian et al. (2003).

O procedimento de transferência nuclear tem demonstrado que genes inativados durante a diferenciação tecidual podem ser completamente reativados pelo processo de reprogramação nuclear. Esse evento se resume na reversão da diferenciação celular, fazendo que a célula adquira novamente a condição de totipotência. A transferência nuclear com célula somática pode ser utilizada para gerar múltiplas cópias de animais geneticamente superiores; para produzir animais transgênicos; para produzirem proteínas de utilidade farmacêuticas ou para genotransplantes (STICE et al., 1998; POLEJAEVA; CAMPBELL, 2000); ou para preservar espécies em extinção.

Em geral, o primeiro passo do processo de clonagem envolve a coleta das células somáticas do animal a ser clonado. A escolha da célula somática para o uso na transferência nuclear varia grandemente (EDWARDS et al., 2003). Tem sido utilizadas células somáticas doadoras provenientes de vários tecidos e de animais de várias idades (fetos, recém nascidos, jovens, adultos e até de animais mortos a um relativo curto período após a morte). Animais clonados vivos têm sido obtidos de aproximadamente 12 dos 200 tipos de tecidos adultos diferenciados que existem nos mamíferos. As razões para isso permanecem desconhecidas. Uma leve suposição existente é que os tecidos de animais mais jovens e tecidos com menos diferenciações seriam a melhor fonte de células doadoras, mas nenhuma evidência conclusiva suporta essa hipótese (VAJTA; GJERRIS, 2006). Após a coleta, as células somáticas podem ser utilizadas imediatamente ou após longo tempo de cultivo (KUBOTA et al., 2000). Bovinos adultos tem sido clonados utilizando células do cumulus (TANI et al., 2001); fibroblastos (HEYMAN et al., 2002); células da granulosa (PIEDRAHITA et al., 2002); células da glândula mamária (KISHI et al., 2000); células musculares (SHIGA et al., 1999); células do oviduto (GOTO et al., 1999); e células uterinas (KATO et al., 2000).

O Segundo passo, talvez o mais trabalhoso da transferência nuclear, requer a remoção do DNA materno (enucleação) de um oócito em metafase II (MII). Esse processo exige o uso de micropipetas e se inicia aproximadamente 18 horas após os oócitos terem sido depositados no meio de maturação *in vitro*. A enucleação é realizada usualmente mecanicamente pela fixação do oócito em posição apropriada com a ponta polida de uma pipeta de fixação com um vácuo suave e pela aspiração da cromatina contida em parte do oócito por meio de uma pipeta de enucleação afiada, que ultrapassa a zona pelúcida (VADJA; GJERRIS, 2006).

Para se evitar lises, os oócitos podem ser incubados em presença de um inibidor de microfilamentos (*cytochalasin B*). Essa substância relaxa o citoplasma permitindo a remoção mecânica de 5% a 15% do citoplasma do oócito contendo o DNA materno. Há várias estratégias para encontrar a cromatina no citoplasma do oócito, que devem ser realizadas com cautela para evitar danos e aumentar a eficiência do procedi-

mento (VADJA; GJERRIS, 2006). Na maioria das metodologias, o DNA pode ser visualizado pelo corante *Hoechst* e iluminação ultravioleta.

Para a clonagem de bovinos, os oócitos são geralmente obtidos de fêmeas abatidas em frigoríficos ou de animais vivos, os quais têm seus folículos aspirados com o auxílio do ultrassom (BRÜGGERHOFF et al., 2002).

O próximo passo da transferência nuclear é inserção do núcleo da célula somática no interior do citoplasma do oócito, construindo uma estrutura equivalente a um embrião de uma célula. Para isso, inicialmente, uma célula somática é inserida mecanicamente no espaço perivitelino (EPV) do oócito por meio de micropipetas e, em seguida, a célula somática é integrada ao citoplasma do oócito pela aplicação de pulsos elétricos (GIBBONS et al., 2002). A célula somática no interior do EPV é alinhada entre dois eletrodos, e pulsos com uma corrente elétrica (por exemplo: 2.2 kV/cm por 40 μ s) poderá produzir mais de 70% de estruturas fusionadas (EDWARDS et al., 1999). A eletrofução é dependente do contato da célula somática com o citoplasma do oócito, em que as membranas de cada citoplasma poderão interagir após a formação de poros (FIRST; PRATHER, 1991). Dentro de poucos minutos, após a introdução da célula somática no citoplasma, ocorre a quebra da membrana nuclear e a condensação da cromatina (CAMPBELL et al., 1996).

Em muitos casos, o pulso elétrico utilizado para fusão é suficiente para ativar o embrião clonado a se desenvolver. No entanto, o método de escolha de ativação nuclear do oócito reconstruído é por combinações químicas (GIBBONS et al., 2002) que mimetizam as ações dos espermatozoides após a fecundação. Após a ativação química, os embriões reconstruídos são cultivados e começam a clivar. Nos bovinos, uma transferência não cirúrgica do embrião para o útero da fêmea receptora pode ser realizada sete dias após a ativação e o período cultivo.

Com a transferência nuclear convencional tem sido relatado o nascimento de animais vivos de 11 espécies, incluindo bovinos, suínos, ovinos e caprinos (EDWARDS et al., 2003).

Aplicações da transferência nuclear

A clonagem animal apresenta teoricamente ilimitadas aplicações na pesquisa, indústria e agricultura, apesar do baixo nível de eficiência. No entanto, esforços estão sendo empregados para aumentar a eficiência ou identificar situações em que o presente nível de eficiência possa resultar em avanços na competência (GABOR; GJERRIS, 2006).

Tem sido sugerido que as aplicações da clonagem de animais de fazenda sejam divididas em duas áreas: (a) biomédica; e (b) agropecuária (LEWIS et al., 2004).

Aplicações biomédicas

O maior potencial da clonagem de animais de fazenda parece ser para as aplicações biomédicas. Desde a década de 1980, tem sido possível modificar mamíferos geneticamente por meio da injeção de cópias de genes desejáveis no interior dos pró-núcleos no zigoto. No entanto, esse método é extremamente ineficiente, pois a maioria dos embriões injetados não se desenvolve, e menos de 1% dos animais nascidos apresenta a mudança genética desejada (GABOR; GJERRIS, 2006). Além disso, o método pode introduzir somente novos genes no genoma e estes podem causar problemas, porque o local de integração é aleatório (PATERSON et al., 2003).

Após várias tentativas, a transferência nuclear de célula somática tem se configurado na forma mais eficiente de produzir animais geneticamente modificados. Pela introdução de modificações genéticas nas células doadoras e escolha daquelas com a mudança desejada para o procedimento de clonagem, modificações genéticas mais precisas no genoma animal podem ser garantidas. Ademais, pela perspectiva econômica e aplicações biomédicas, a ineficiência da tecnologia de clonagem é um problema menor, uma vez que os animais que serão criados terão um valor comercial relativamente alto. Adicionalmente, a transferência nuclear com célula somática pode ser utilizada para uma rápida multiplicação dos animais transgênicos, os quais irão carregar as mudanças desejadas (PATERSON et al., 2003).

As duas aplicações da transferência nuclear animal que parecem ser mais realistas para os próximos anos são a criação de animais

modelos para doenças humanas e os animais biorreatores (GABOR; GJERRIS, 2006).

Modelos para doenças

Os modelos para doenças são animais preparados para expressar, genotipicamente e fenotipicamente certa doença humana. Eles podem ser utilizados tanto para o entendimento da doença, como para iniciar testes para possíveis tratamentos. No entanto, esses modelos apresentam limitações devido às diferenças fisiológicas com o humano, e também devido ao limitado tempo de vida dos animais, especialmente o camundongo (GABOR; GJERRIS, 2006). Os animais geneticamente modificados podem oferecer uma solução para esse problema. Um exemplo disso é mencionado por Paterson et al. (2003), em que a criação de uma ovelha que expressa fibrose cística é prevista. Os ovinos e especialmente os suínos são animais ideais para esse objetivo, devido às similaridades na fisiologia e no tamanho dos órgãos com os humanos. Além disso, esses animais são relativamente baratos, a reprodução e manutenção são bem estabelecidas, e o longo tempo de vida permite que as doenças se manifestem como nos humanos. Um grande número de genes candidatos está disponível para o possível estabelecimento de doenças humanas, incluindo doenças neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer), alterações de pele (psoríase) ou outras doenças com suspeita ou com genética conhecida, tais como: diabetes *mellitus*, arteriosclerose e câncer de mama.

Biorreatores

Os Biorreatores são animais transgênicos que apresentam genes que produzem proteínas humanas inseridas no genoma animal. Essas proteínas podem ser recuperadas do animal e utilizadas no setor biomédico para fins medicinais. A maioria das pesquisas nesse campo tem sido desenvolvida para obter animais transgênicos para expressarem proteínas desejadas no leite. Potencialmente, proteínas para o tratamento de várias doenças humanas podem ser produzidas dessa forma no futuro. Proteínas tais como o fator de coagulação IX, anti-trombina humana e alfa 1-antitripsina têm sido recuperadas experimentalmente de animais transgênicos e clonados. Entretanto, a

ineficiência das tecnologias e a rigorosa regulação da medicina são obstáculos para o desenvolvimento da tecnologia dos biorreatores. O risco da introdução de novas doenças nos humanos (zoonoses) pelo uso de animais tem criado a necessidade de amplos testes para esses compostos biológicos recuperados antes da comercialização. Ainda, o custo de produção total – incluindo a construção do gene, a produção do animal transgênico, a extração e purificação do produto –, deve ser comparado com as oportunidades de renda para ampliar a viabilidade comercial (LEWIS et al., 2004).

Aplicações agropecuárias

Embora os problemas técnicos e científicos sejam similares a área biomédica, as aplicações da clonagem na agropecuária têm sido altamente produtivas, por tornar eventualmente o procedimento viável com custo eficiente.

A clonagem tem sido utilizada para criar cópias de animais com alto valor genético, tais como vacas com alta produção de leite ou touros com qualidade de carne superior (PATERSON et al., 2003). Alternativamente, a clonagem pode ser utilizada para produzir cópias de animais cuja linhagem são especialmente demandadas nos programas de cruzamento, e dessa forma, evitando a necessidade de repetir vários ciclos de cruzamento. Como exemplo, clonar um touro que tem uma linhagem desejada e utilizá-lo para o cruzamento e aumentar o número de filhos; ou clonar um grande número de animais para melhorar a qualidade genética geral do rebanho (PATERSON et al., 2003).

A clonagem combinada com a modificação genética animal tem sido considerada uma melhor opção para competir com os esquemas de cruzamentos tradicionais, uma vez que características que não podem ser introduzidas de outra maneira nos animais podem, com essa associação, ser disseminadas para uma população. Nesse caso, as principais estratégias de associação entre a clonagem e modificação genética incluem o aumento da resistência de uma animal a doenças, tais como a mastite (WALL et al., 2005), touros transgênicos que produzem somente filhas fêmeas ou somente filhos machos (FABER et al., 2003), e vacas leiteiras que produzem caseína modificada e alteração na sua proporção, melhorando desta forma a qualidade no leite

(BROPHY et al., 2003). Uma outra possibilidade é gerar animais que podem produzir menos efeitos negativos ao meio ambiente. O exemplo mais conhecido desse caso é o *enviropigTM*, ou seja, um suíno que tem a capacidade de digerir o fitato das plantas e, dessa forma, liberar menos fosfato nas fezes e consequente menos poluição ambiental (KUES; NIEMANN, 2004).

Uma das preocupações na produção de animais clonados está relacionada ao possível risco a saúde humana devido ao consumo dos produtos desses animais. Porém, Takahashi e Yoshihio (2004) não encontraram diferenças biológicas entre a carne de bovinos clonados com o uso de células embrionárias e somáticas em comparação com animais não clonados. Da mesma forma, Tomé et al. (2004) não encontraram diferenças no valor nutricional do leite e da carne de produtos bovinos clonados em comparação aos não clonados. Embora, os produtos de animais clonados pareçam não apresentar riscos a saúde humana, é preciso levar em conta as limitações na metodologia e quantidade das pesquisas para confirmar a inocuidade dos produtos clonados.

Finalmente, uma das barreiras para implementação da clonagem na agropecuária é o fato de os clones não serem cópias exatas de um animal já existente, pois o DNA mitocondrial proveniente do oócito sempre representará uma pequena parte diferente no novo indivíduo. A importância desse fato ainda não está clara. Além disso, os efeitos epigenéticos influenciam também a similaridade no nível do fenótipo entre o animal original e o animal clone (VADJA; GJERRIS, 2006).

Problemas ligados ao procedimento de transferência nuclear

A maior limitação da clonagem de bovinos adultos utilizando a transferência nuclear de célula somática é a extrema ineficiência na produção de descendentes vivos. A morte de embriões e fetos clonados ocorre durante toda a prenhez. Além disso, uma alta proporção dos animais geralmente são maiores que o normal e morrem logo após o nascimento (EDWARDS et al., 2003).

Em geral, tem havido, no mínimo, cinco períodos de perdas observadas nos clones derivados de animais adultos. O primeiro, talvez o mais drástico, ocorre durante o desenvolvimento pré-implantacional. Em bovinos (WELLS et al., 1998; HILL et al., 2000; EDWARDS

et al., 2001), assim como em outras espécies, incluindo caprinos, ovinos e coelhos, mais de 65% dos embriões de uma célula falham em se desenvolver em mórula compacta ou blastocisto.

Aproximadamente 50% dos embriões clonados de bovinos estabelecem prenhez após a transferência de um único embrião em fêmeas receptoras. Entretanto, próximo dos 30 dias e continuando até 60 dias de prenhez, a morte embrionária pode ocorrer em 50 a 100% das prenhez de clone (ausência de batimento cardíaco e destacamento das membranas fetais), caracterizando o segundo período de perdas de prenhez (EDWARDS et al., 2003).

As perdas nas prenhez de fetos clonados são significativamente mais altas que o esperado para animais provenientes de forma natural (HASLER, 1998). A avaliação da placenta de embriões clonados na idade entre 40 e 50 dias de gestação, revela que as placentas são hipoplásicas, parcialmente desenvolvidas, com cotilédones rudimentares, ou eventualmente normais quando comparadas com placentas derivadas de embriões de fecundação *in vitro* (HILL et al., 2000).

O terceiro período de perdas tem sido notado associado com o aumento de abortos espontâneos durante o segundo trimestre de prenhez (EDWARDS et al., 2001). Exames macroscópicos e histopatológicos dos fetos abortados tem demonstrado poucas anormalidades, porém, a placenta frequentemente se apresenta de forma anormal, com uma marcada redução dos cotilédones (menos de 20 cotilédones, quando se espera para este período 70 a 120 estruturas). As membranas fetais também se apresentam delgadas e edematosas (SCHLAFER et al., 2000).

O quarto período de perdas observadas para prenhez de bovinos clonados ocorre durante o terceiro trimestre, entre os dias 200 a 265 de gestação. As perdas durante esse período são caracterizadas pela grande incidência de hidroalantóide e morte fetal (CHAVATTE-PALMER et al., 2002). Além disso, o hidroalantóide é acompanhado pela redução do número de placentomas, hipertrofia de cotilédones e edema de membrana intercotiledornária (EDWARDS et al., 2003). Anasarca fetal com edema generalizado do umbigo são usualmente presentes. Dessa forma, a morte de fetos clonados ocorre primariamente devido a inadequada placentação (EDWARDS et al., 2003).

Líquido amniótico e mecônio estão geralmente presentes no pulmão de todos os fetos a termo, indicando algum grau de estresse no útero antes da morte. A maioria dos bezeros derivados de uma placenta anormal necessita de monitoramento intensivo e terapia após o nascimento para tratar toda uma infinidade de complicações. Os principais problemas encontrados são imaturidade pulmonar, hipertensão pulmonar, dificuldade respiratória, hipóxia, hipotermia, hipoglicemia, acidose metabólica, aumento de veias e artérias umbilicais (HILL et al., 2000). No entanto, a severidade das complicações pode não ser evidente por vários meses após o nascimento.

De acordo com Vadja e Gjerris (2006), as anormalidades relacionadas com a técnica de transferência nuclear podem ser causadas pelos seguintes fatores: inapropriada célula doadora ou oócito receptor; inapropriada sincronia entre a fase do ciclo celular do núcleo doador e o citoplasma receptor; inadequada reprogramação do genoma doador; inapropriada manipulação dos oócitos, células somáticas e dos embriões durante o cultivo; várias manipulações mecânicas, osmóticas, elétricas, térmicas e outros tipos de danos.

Apesar da extrema ineficiência da clonagem com células somáticas, há clones nascidos normais e saudáveis, requerendo poucos cuidados após o nascimento (LANZA et al., 2001). Pace et al. (2002) têm observado similares taxas de crescimento, desempenho reprodutivo e características lactacionais dos animais clonados em comparação com bovinos leiteiros não clonados.

O sucesso da transferência nuclear parece ser devido a uma suficiente atividade de reprogramação presente no citoplasma do oócito para mudar completamente a célula adulta, mas a natureza dos fatores envolvidos não tem sido precisamente caracterizada (ALLEGRUCCI et al., 2005).

Considerações finais

As biotécnicas de reprodução animal se encontram em várias fases de desenvolvimento. A inseminação artificial e a transferência de embrião são as tecnologias mais consolidadas, porém a fecundação *in vitro* já assume lugar de destaque no cenário nacional, especialmente para o criador da raça Nelore, pois a raça possui característica

privilegiada na produção de oócitos e conseqüentemente embriões *in vitro*. A produção *in vitro* de embriões é a abordagem mais nova e flexível entre todas, entretanto requer mais cuidados técnicos, uma vez que exige equipamentos e conhecimentos laboratoriais específicos, para garantir a qualidade do embrião *in vitro*. A clonagem animal por transferência nuclear de células somáticas se constitui em uma área de rápido desenvolvimento e uma técnica muito valiosa para produzir animais com genética superior, bem como cópias de animais transgênicos. No entanto, para melhorar a eficiência dessa técnica são necessários mais estudos sobre a reprogramação dos genes e sobre as alterações epigenéticas no embrião e ao longo da vida do animal clonado.

Referências

- ALLEGRUCCI, C.; THURSTON, A.; LUCAS, E.; YOUNG, L. Epigenetics and the germline. **Reproduction**, v. 129, p. 137–149, 2005.
- AMAN, R. R.; PARKS, J. E. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro* matured bovine oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 103–110, 1994.
- ARAV, A.; YAVIN, S.; ZERON, Y.; NATAN, D.; DEKEL, I.; GACITUA, H. New trends in gamete's cryopreservation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, p. 77–81, 2002.
- ASBIA, Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Relatório estatístico de produção, importação e comercialização de sêmen. 2008.
- BARROS, C. M.; MOREIRA, M. B. P.; FIGUEIREDO, R. A.; TEIXEIRA, A. B.; TRINCA, L. A. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF2 α and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 53, p. 1121-1134, 2000.
- BERTOLINI, M.; BEAM, S. W.; SHIM, H.; BERTOLINI, L. R.; MOYER, A. L.; FAMULA, T. R.; ANDERSON, G. B. Growth, development, and gene expression by *in vivo*- and *in vitro*-produced day 7 and 16 bovine embryos. **Molecular Reproduction Development**, v. 63, p. 318-328, 2002.
- BETTERIDGE, K. J. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 203–244, 2003.
- BILTON, R. J.; MOORE, N. W. Factors affecting the viability of frozen stored cattle embryos. **Australian Journal of Biological Science**, v. 32, p. 101–107, 1979.
- BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 307–326, 2003.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, p. S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRIBULO, R.; TRIBULO, H.; MAPLETOFT, R. J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 53-72, 2002.

BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DONAWICK, W. J.; EVANS, J. F.; VESSEL, M. A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 147-158, 1982.

BROPHY, B.; SMOLENSKI, G.; WHEELER, T.; WELLS, D.; L'HUILLIER, P.; LAIBLE, G. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of α -casein and κ -casein. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 157-162, 2003.

BRUGGERHOFF, K.; ZAKHARTCHENKO, V.; WENIGERKIND, H.; REICHENBACH, H. D.; PRELLE, K.; SCHERNTHANER, W.; ALBERIO, R.; KUCHENHOFF, H.; STOJKOVIC, M.; BREM, G.; HIENDLEDER, S.; WOLF, E. Bovine somatic cell nuclear transfer using recipient oocytes recovered by ovum pick-up: effect of maternal lineage of oocyte donors. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 367-373, 2002.

BUNGARTZ, L.; NIEMANN, H. Effects of a dominant follicle on ovarian responses of dairy cows following various superovulatory treatment schedules. **Theriogenology**, v. 39, n. 1, p. 198, 1993.

BURATINI JUNIOR, J.; PRICE, C. A.; VISINTIN, J. A.; BÓ, G. A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v. 54, p. 421-431, 2000.

BOUSQUET, D., TWAGIRAMUNGU, H., DUROCHER, J. et al. Effect of LH injection before ovum pick-up on *in vitro* embryo production with oocytes collected at different intervals after the last FSH injection. **Theriogenology**, v. 53, p. 347, 2000.

CAMPBELL, K. H.; LOI, P.; OTAEGUI, p. J.; WILMUT, I. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. **Reviews of Reproduction**, v. 1, p. 40-46, 1996.

CARVALHAIS, I.; MARQUES, C. C.; BAPTISTA, M. C.; VASQUES, M. I.; HORTA, A. E. M.; PEREIRA, R. M. Effect of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) on post-thaw viability of biopsied bovine embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 334-335, 2006.

CHA, K. Y.; CHIAN, R. C. Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. **Human Reproduction Update**, v. 4, p. 103-120, 1998.

- CHAVATTE-PALMER, P.; HEYMAN, Y.; RICHARD, C.; MONGET, P.; LEBOURHIS, D.; KANN, G.; CHILLIARD, Y.; VIGNON, X.; RENARD, J. p. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1596–1603, 2002.
- CORRÊA, G. A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T. C.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 132-142, 2008.
- CRITSER, J. K.; MOBRAATEN, L. E. Cryopreservation of murine spermatozoa. **Ilar Journal**, v. 41, p. 197-206, 2000.
- CROSIER, A. E.; FARIN, p. W.; DYKSTRA, M. J.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, C. E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1375-1385, 2001.
- DE JARNETTE, J. M.; BARNES, D. A.; MARSHALL, C. E. Effects of pre- and post-thaw thermal. Insults on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **Theriogenology**, v. 53, p. 1225-1238, 2000.
- DIELEMAN, S. J.; HENDRIKSEN, p. J. M.; VIUFF, D.; THOMSEN, p. D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H. M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T. A.; NIEMANN, H.; GADELLA, B. M.; BEVERS, M. M.; VOS, p. L. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v. 57, p. 5-20, 2002.
- DINNYÉS, A.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; MASSIP, A.; MERMILLOD, p. Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced *in vitro* in synthetic oviduct fluid. **Theriogenology**, v. 46, p. 1425-1439, 1996.
- DODE, M. A.; RODOVALHO, N. C.; UENO, v. G.; FERNANDES, C. E. The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of *Bos indicus* oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 69, p. 15-23, 2002.
- DODE, M. A. N. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 115-130, 2006. Suplemento 1.
- DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C.; UENO, v. G.; ALVES, R. G. A. Number and morphology of oocytes obtained from ovaries of zebu cows according to follicle size, physiological status and season. **Archivos de Zootecnia**, v. 50, p. 415-418, 2001.
- DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C. M.; UENO, v. G.; ALVES, R. G. O. Efeito do tamanho do folículo na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de fêmeas zebuínas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 207-217, 2000a.
- DODE, M. A. N.; ADONA, p. R.; RODOVALHO, N. C. M. Retenção da meiose de ovócitos bovinos em líquido folicular de folículos de vários tamanhos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 28, n. 1, p. 241, 2000b.

- DONALDSON, L. E. Embryo production in superovulated cows: Transferable embryos correlated with total embryos. **Theriogenology**, v. 21, n. 4, p. 517-524, 1984.
- EDWARDS, J. L.; DORADO, C. M.; WILSON, T. J.; SCHRICK, F. N. Development of cloned embryos reconstructed with serum fed or serum starved adult granulosa cells. **Theriogenology**, v. 55, p. 265, 2001.
- EDWARDS, J. L.; POWELL, A. M.; TALBOT, N. C.; GARRETT, W. M.; PURSEL, v. G. Developmental potential of reconstructed embryos activated immediately or 4 hours after assessment of fusion with fetal fibroblasts. **Theriogenology**, v. 51, p. 202, 1999.
- EDWARDS, J. L.; SCHRICK, F. N.; MCCracken, M. D.; VAN AMSTEL, S. R.; HOPKINS, F. M.; WELBORN, M. G.; DAVIES, C. J. Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 50, p. 113-123, 2003.
- ERENO, R. L.; BARREIROS, T. R. R.; SENEDA, M. M.; BARUSELLI, p. S.; PEGORER, M. F.; BARROS, C. M. Taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes tratadas com progesterona associada à remoção temporária de bezeros ou aplicação de gonadotrofina coriônica equina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 5, Viçosa, MG, set./out. 2007.
- FABER, D. C.; MOLINA, J. A.; OHLRICH, C. L.; VAN DER ZWAAG, D. F.; FERNE, L. B. Commercialization of animal biotechnology. **Theriogenology**, v. 59, p. 125–138, 2003.
- FARIN, P.; CROSIER, A. E.; FARIN, C. E. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v. 55, p. 151-170, 2001.
- FIRST, N. L.; PRATHER, R. S. Production of embryos by oocyte cytoplasm–blastomere fusion in domestic animals. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 43, p. 245–254, 1991.
- FUCHINOUE, K.; FUKUNAGA, N.; CHIBA, S.; NAKAJO, Y.; YAGI, A.; KYONO, K. Freezing of human immature oocytes using cryoloops with Taxol in the vitrification solution. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 21, p. 307–309, 2004.
- GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, p. 599-616, 2003.
- GIBBONS, J.; ARAT, S.; RZUCIDLO, J.; MIYOSHI, K.; WALTENBURG, R.; RESPESS, D.; VENABLE, A.; STICE, S. Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 895–900, 2002.

- GILMORE, J. A.; LIU, J.; WOODS, E. J.; PETER, A. T.; CRITSER, J. K. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. **Human Reproduction**, v. 15, p. 335-343, 2000.
- GINTHER, O. J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J. p. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 223-230, 1989.
- GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, p. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996.
- GOODHAND, K. L. L.; WATT, R. G.; STAINES, M. E.; HUTCHINSON, J. S.; BROADBENT, p. J. In vivo oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, v. 51, p. 951-961, 1999.
- GORDON, I. (Ed.). **Laboratory Production of cattle embryos**. 2nd ed. Wallingford: CABI Publishing, 2003. 548 p.
- GOTO, Y.; KANEYAMA, K.; KOBAYASHI, S.; IMAI, K.; SHIN-NOH, M.; TSUJINO, T.; NAKANO, T.; MATSUDA, S.; NAKANE, S.; KOJIMA, T. Birth of cloned calves derived from cultured oviductal epithelial cells of a dairy cow. **Animal Science Journal**, v. 70, p. 243–245, 1999.
- HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995.
- HASLER, J. F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 245–264, 2003.
- HASLER, J. F. The current status of oocyte recovery, *in vitro* embryo production, and embryo transfer in domestic animals with an emphasis on the bovine. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 52–74, 1998.
- HASLER, J. F.; MCCAULEY, A. D.; LATHROP, W. F.; FOOTE, R. H. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 27, n. 1, p. 139-168, 1987.
- HEAPE, W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. **Proceedings of the Royal Society B**, B 48, p. 457–458, 1891.
- HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LEBOURHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J. p. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 6–13, 2002.

HILL, J. R.; BURGHARDT, R. C.; JONES, K.; LONG, C. R.; LOONEY, C. R.; SHIN, T.; SPENCER, T.; THOMPSON, J. A.; WINGER, Q. A.; WESTHUSIN, M. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1787–1794, 2000.

HOLM, P.; BOOTH, p. J.; SCHMIDT, M. H.; GRAVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo – inositol or without serum – proteins. **Theriogenology**, v. 52, p. 683-700, 1999.

HOLT, W. v. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.

JONES, A. L.; LAMB, G. C. Nutrition, synchronization, and management of beef embryo transfer recipients. **Theriogenology**, v. 69, p. 107-115, 2008.

KASAI, M.; ITO, K.; EDASHIGE, K. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. **Human Reproduction**, v. 17, p. 1863–74, 2002.

KASTELIC, J. P.; KNOPF, L.; GINTHER, O. J Effect of day of prostaglandin F2 α treatment on selection and development of ovulatory follicles in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 23, p. 169, 1990.

KATKOV, I. I.; MAZUR, p. Factors affecting yield and survival of cells when suspensions are subjected to centrifugation. Influence of centrifugal acceleration, time of centrifugation, and length of the suspension column in quasi-homogeneous centrifugal fields. **Cell Biochem Biophys**, v. 31, p. 231-245, 1999.

KATO, Y.; TANI, T.; TSUNODA, Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 120, p. 231–237, 2000.

KISHI, M.; ITAGAKI, Y.; TAKAKURA, R.; IMAMURA, M.; SUDO, T.; YOSHINARI, M.; TANIMOTO, M.; YASUE, H.; KASHIMA, N. Nuclear transfer in cattle using colostrum-derived mammary gland epithelial cells and ear-derived fibroblast cells. **Theriogenology**, v. 54, p. 675–684, 2000.

KUBOTA, C.; YAMAKUCHI, H.; TODOROKI, J.; MIZOSHITA, K.; TABARA, N.; BARBER, M.; YANG, X. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 97, p. 990–995, 2000.

KUES, W. A.; NIEMANN, H. The contribution of farm animals to human health. **Trends in Biotechnology**, v. 22, p. 286–294, 2004.

KUWAYAMA, M.; FUJIKAWA, S.; NAGAI, T. Ultrastructure of IVM-IVF bovine blastocysts vitrified after equilibration in glycerol and 1,2-propanediol using 2 step and 16-step procedures. **Cryobiology**, v. 31, p. 415–22, 1994.

- KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; IEDA, S.; KATO, O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 11, p. 608–614, 2005.
- LANZA, R. P.; CIBELLI, J. B.; FABER, D.; SWEENEY, R. W.; HENDERSON, B.; NEVALA, W.; WEST, M. D.; WETTSTEIN, p. J. Cloned cattle can be healthy and normal. **Science**, v. 294, p. 1893–1894, 2001.
- LARSON, L. L.; BALL, p. J. H. Regulation of estrous cycles in dairy cattle: A review. **Theriogenology**, v. 38, p. 255-267, 1992.
- LEIBO, S. P.; LOSKUTOFF, N. M. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 39, p. 81-94, 1993.
- LEWIS, I. M.; FRENCH, A. J.; TECIRLIOGLU, R. T.; VAJTA, G.; MCCLINTOCK, A. E.; NICHOLAS, K. R.; ZUELKE, K. A.; HOLLAND, M. K.; TROUNSON, A. O. Commercial aspects of cloning and genetic modification in cattle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 44, p. 1105–1111, 2004.
- LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A. C. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 137-152, 2006.
- LÓPEZ-BÉJAR, M.; LÓPEZ-GATIUS, F.; CAMÓN, J.; RUTLLANT, J.; LABÈRNIA, J. Development *in vitro* of rabbit embryos after freezing by two-step or ultra-rapid cooling methods. **Zentralbl Veterinarmed A**, v. 41, n. 10, p. 780-790, 1994.
- MAPLETOFT, R. J.; MARTÍNEZ, M. F.; COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. p. The use of controlled internal drug release devices for the regulation of bovine reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. E28–E36, 2003. E Supplement 2.
- MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, K. B.; ADAMS, G. p. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, p. 601-611, 2002.
- MARQUES, C. C.; BAPTISTA, M. C.; VASQUES, M. I.; HORTA, A. E. M.; PEREIRA, R. M. Effect of polyunsaturated fatty acids (PUFA) on bovine oocyte *in vitro* maturation and subsequent embryo development and freezability. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 108–109, 2007.
- MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S. p. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 1059–1069, 1996.
- MAVRIDES, A.; MORROL, D. Bypassing the effect of zona pellucida changes on embryo formation following cryopreservation of bovine oocytes. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 18, p. 66–70, 2005.
- MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**, v. 19, p. 55-81, 1983.

MORATO, R.; IZQUIERDO, D.; ALBARRACIN, J. L.; ANGUITA, B.; PALOMO, M. J.; JIMENEZ-MACEDO, A. R.; PARAMIO, M. T.; MOGAS, T. Effects of pre-treating *in vitro*-matured bovine oocytes with the cytoskeleton stabilizing agent taxol prior to vitrification. **Molecular Reproduction Development**, v. 75, p. 191–201, 2008.

PACE, M. M.; AUGENSTEIN, M. L.; BETTHAUSER, J. M.; CHILDS, L. A.; EILERTSEN, K. J.; ENOS, J. M.; FORSBERG, E. J.; GOLUEKE, p. J.; GRABER, D. F.; KEMPER, J. C.; KOPPANG, R. W.; LANGE, G.; LESMEISER, T. L.; MALLON, K. S.; MELL, G. D.; MISICA, p. M.; PFISTER-GENSKOW, M.; STRELCHENKO, N. S.; VOELKER, G. R.; WATT, S. R.; BISHOP, M. D. Ontogeny of cloned cattle to lactation. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 334–339, 2002.

PATERSON, L.; DESOUSA, P.; RITCHIE, W.; KING, T.; WILMUT, I. Application of reproductive biotechnology in animals: implications and potentials. Applications of reproductive cloning. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 137–143, 2003.

PEIXER, M. A. S.; RUMPF, R.; de BEM, A. R. et al. Produção de embriões e gestações a partir de ovócitos recuperados por ultrasonografia em fêmeas super-ovuladas. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 24, n. 1, p. 231, 1996.

PELLI, I. First show of a group of calves born from artificial insemination and of cows inseminated artificially. **Nuova Veterinaria**, v. 16, p. 151-156, 1938.

PHELPS, M. J.; LIU, J.; BENSON, J. D.; WILLOUGHBY, C. E.; GILMORE, J. A.; CRITSER, J. K. Effects of Percoll separation, cryoprotective agents, and temperature on plasma membrane permeability characteristics of murine spermatozoa and their relevance to cryopreservation. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1031-1041, 1999.

PIEDRAHITA, J. A.; WELLS, D. N.; MILLER, A. L.; OLIVER, J. E.; BERG, M. C.; PETERSON, A. J.; TERVIT, H. R. Effects of follicular size of cytoplasm donor on the efficiency of cloning in cattle. **Molecular Reproduction Development**, v. 61, p. 317–326, 2002.

POLEJAEVA, I. A.; CAMPBELL, K. H. S. New advances in somatic cell nuclear transfer: Application in transgenesis. **Theriogenology**, v. 53, p. 117-126, 2000.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, London, v. 164, p. 166, 1949.

POLLARD, J. W.; LEIBO, p. Chilling sensitivity of mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 41, p. 107–112, 1994.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂ α and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915-923, 1995.

- ROJAS, C.; PALOMO, M. J.; ALBARRACIN, J. L.; MOGAS, T. Vitrification of immature and *in vitro* matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. **Cryobiology**, v. 49, p. 211–220, 2004.
- RUBIN, K. C. P.; PONTES, J. H. F.; NONATO JUNIOR, I.; ERENO JUNIOR, J. C.; PANSARD, H.; SENEDA, M. M. Influência do grau de sangue Nelore na produção *in vitro* de oócito. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 183, 2005. Suplemento 1.
- SALAMONE, D. F.; DAMIANI, P.; FISSORE, R. A.; ROBL, J. M.; DUBY, R. T. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1761-1768, 2001.
- SCHIMSHICK, E.; MCCONNELL, H. Lateral phase separation in phospholipid membranes. **Biochemistry**, v. 12, p. 2351-2360, 1973.
- SCHLAFER, D. H.; FISHER, p. J.; DAVIES, C. J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 145–160, 2000.
- SEIDEL, G. E. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: BOVINE EMBRYO TRANSFER WORKSHOP, 70., Sydney, 1984. **Proceedings**. Sydney: The post-graduate committee in veterinary science, 1984. p.107-114.
- SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 37–43, 2001.
- SENGER, p. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2nd. ed. Pullman: Current Conceptions, 2005.
- SHIGA, K.; FUJITA, T.; HIROSE, K.; SASAE, Y.; NAGAI, T. Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese black bulls. **Theriogenology**, v. 52, p. 527–535, 1999.
- SPELL, A. R.; BEAL, W. E.; CORAH, L. R.; LAMB, G. C. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 287-297, 2001.
- STICE, S. L.; ROBL, J. M.; PONCE DE LEON, F. A.; JERRY, J.; GOLUEKE, p. G.; CIBELLI, J. B.; KANE, J. J. Cloning: new breakthroughs leading to commercial opportunities. **Theriogenology**, v. 49, p. 129-138, 1998.
- STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, p. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 904-909, 2001.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual of the International Embryo Transfer Society**. Savoy: International Embryo Transfer Society, 1998.

STROUD, B.; HASLER, J. F. Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. **Theriogenology**, v. 65, p. 65-76, 2006.

SUCCU, S.; LEONI, G. G.; BERLINGUER, F.; MADEDDU, M.; BEBBERE, D.; MOSSA, F.; BOGLIOLO, L.; LEDDA, S.; NAITANA, S. Effect of vitrification solutions and cooling upon *in vitro* matured prepubertal ovine oocytes. **Theriogenology**, v. 68, p. 107–114, 2007.

TAKAHASHI, S.; YOSHIHIO, I. Evaluation of meat products from cloned cattle: biological and biochemical properties. **Cloning Stem Cells**, v. 6, p. 165–171, 2004.

TANI, T.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 324–330, 2001.

THIBIER, M. Data Retrieval Committee Statistics of Embryo Transfer - Year 2007. The worldwide activity in farm animals embryo transfer. **International Embryo Transfer Society Newsletter**, v. 26, n. 4, Dec. 2008.

THIBIER, M.; WAGNER, H. G. World statistics for artificial insemination in cattle. **Livestock Production Science**, v. 74, n. 2, p. 203-212, March 2002.

THOMPSON, J. G. Comparison between *in vivo*-derived and *in vitro*-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, p. 341-354, 1997.

TIAN, X. C.; KUBOTA, C.; ENRIGHT, B.; YANG, X. Cloning animals by somatic cell nuclear transfer – biological factors. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 98, p. 1-17, 2003.

TOMÉ, D.; DUBARRY, M.; FROMENTIN, G. Nutritional value of milk and meat products derived from cloning. **Cloning Stem Cells**, v. 6, p. 172–177, 2004.

TOMINAGA, K. Cryopreservation and sexing of *in vivo* and *in vitro*-produced bovine embryos for their practical use. **Journal Reproduction and Development**, v. 50, p. 29–38, 2004.

TRIMBERGER, G. W. Breeding efficiency in dairy cattle from artificial insemination at various intervals before and after ovulation. **Research Bulletin**, Nebraska Agricultural Experiment Station, n. 153, p. 1-26, 1948.

VAJTA, G.; GJERRIS, M. Science and technology of farm animal cloning: state of the art. **Animal reproduction science**, v. 92, p. 211-302, 2006.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P. J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproductive Development**, v. 51, p. 53–58, 1998.

- VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Factors affecting survival rates of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 191-200, 1997.
- VAN SOOM, A.; BOERJAN, M. L.; YSEBAERT, M. T.; KUIF, A. Cell allocation to the inner cell mass and the trophoctoderm in bovine embryos cultured in two different media. **Molecular Reproductio Development**, v. 45, p. 171-182, 1996.
- VAN VLIET, J. H.; VAN EERDENBURG, F. J. C. M. Sexual activities and oestrus detection in lactating Holstein cows. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 50, p. 57-69, 1996.
- VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. **Theriogenology**, v. 65, p. 914-925, 2006.
- VINCENT, C.; JOHNSON, M. N. Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. **Oxford reviews of reproductive biology**, v. 14, p. 73–100, 1992.
- VISHWANATH, R.; SHANNON, p. Storage of bovine in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 23-53, 2000.
- VIUFF, D.; RICKORDS, L.; OFFENBERG, H.; HYTTTEL, P.; AVERY, B.; GREVE, T.; OLSAKER, I.; WILLIAMS, J. L.; CALLESEN, H.; THOMSEN, p. D. A high proportion of bovine blastocyst produced *in vitro* are mixiploid. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1273-1278, 1999.
- VOLKEL, S. A.; HU, Y. X. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v. 37, p. 23–37, 1992.
- WALL, R. J.; POWELL, A. M.; PAAPE, M. J.; KERR, D. E.; BANNERMAN, D. D.; PURSEL, v. G.; WELLS, K. D.; TALBOT, N.; HAWK, H. W. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. **Nature Biotechnology**, p. 23, v. 445–451, 2005.
- WASSARMAN, p. M.; ALBERTINI, D. F. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. (Ed.). **The physiology of reproduction**. New York: Raven, 1994. p. 79-122.
- WATSON, p. F. The causes of the reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.
- WATTIAUX, M. A. **Heat detection, natural service and artificial insemination**. In: Babcock Institute for International Dairy Research and Development. University of Wisconsin. Disponível em: <http://www.infodairy.com/infodairy_upload_files/Cows_heifers_calves/Reproduction/0187Heat%20determination,%20natural%20and%20artificial%20insemination-e.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2009.

WELLS, D. N.; MISICA, p. M.; TERVIT, H. R.; VIVANCO, W. H. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 10, p. 369–378, 1998.

WILLETT, E. L.; BLACK, W. G.; CASIDA, L. E.; STONE, W. H.; BUCKNER, p. J. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. **Science**, v. 113, p. 247, 1951.

WILLOUGHBY, C. E.; MAZUR, P.; PETER, A. T.; CRITSER, J. K. Osmotic tolerance limits and properties of murine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 715–727, 1996.

WOODS, E. J.; BENSON, J. D.; AGCA, Y.; CRITSER, J. K. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology**, v. 48, p. 146-156, 2004.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J. W.; NIEMANN, H. Expression of the gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 108, p. 17-24, 1996.

WRIGHT, J. M. Non-surgical embryo transfer in cattle: embryo recipient interactions. **Theriogenology**, v. 15, p. 43–56, 1981.

WRIGHT JUNIOR, R. W.; ELLINGTON, J. Morphological and physiological differences between *in vivo* and *in vitro*-produced preimplantation embryos from livestock species. **Theriogenology**, v. 44, p. 67-1189, 1995.

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