

Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI): uma Alternativa para Produção de Embriões Bovinos

Foto: Cláudio Bezerra Melo



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos353

Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI): uma Alternativa para Produção de Embriões Bovinos

José Felipe Warmling Spricigo
Margot Alves Nunes Dode

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica – PqEB – Av. W5 Norte
Caixa Postal 02372 – Brasília, DF – Brasil – CEP: 70770-917
Fone: (61) 3448-4700
Fax: (61) 3340-3624
Home page: <http://www.cenargen.embrapa.br/>
E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: Maria Isabela Lourenço Barbirato
Secretário-Executivo: Thales Lima Rocha
Membros: Daniela Aguiar de Souza Kols
 Lígia Sardinha Fortes
 Lucas Machado de Souza
 Márcio Martinelli Sanches
 Rosameres Rocha Galvão
Suplentes: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes
 João Batista Tavares da Silva

Revisão de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães
Normalização bibliográfica: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes
Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães
Tratamento das imagens: José Cesamildo Cruz Magalhães

1ª edição (online)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

As opiniões nesta publicação são de exclusiva e de inteira responsabilidade dos autores, não exprimindo, necessariamente, o ponto de vista da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Spricigo, José Felipe Warmling
Transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI): uma alternativa para produção de embriões bovinos.
/ José Felipe Warmling Spricigo.
— Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2016.

19 p. - (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 353).

1. Transferência de embriões bovinos. 2. Inseminação artificial. I. Dode, Margot Alves Nunes. II. Série.

Autores

José Felipe Warmling Sprícigo

Médico veterinário, doutor, bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Margot Alves Nunes Dode

Médica veterinária, Ph.D, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer aos pesquisadores e alunos que de forma direta ou indireta participaram do delineamento e/ou da execução dos experimentos: Ana Luiza Guimarães; Andrei A. G Fidelis; Felipe M. C. Caixeta; Ivo Pivato; Ligiane O. Lemos; Luiza R. O. Dias; Maurício M. Franco; Severino B. Netto; Venâncio A. O. Silva. Os autores também agradecem aos funcionários do Campo Experimental Fazenda Sucupira por todo o apoio durante os experimentos, e à Geneal Diagnósticos LTDA (Uberaba-MG) pela realização dos exames de DNA para confirmação do parentesco dos bezerros nascidos.

Apresentação

A transferência de embriões é uma biotecnologia utilizada em programas de melhoramento genético para disseminar, de maneira rápida e eficiente, animais geneticamente superiores que expressam características econômicas importantes. Mais recentemente, tem sido utilizada para produzir em larga escala animais com cruzamentos específicos aproveitando a heterose para aumentar a produtividade. Atualmente as opções disponíveis para a produção de embriões a serem transferidos são *in vivo* associada com a superestimulação ovariana das doadoras, e *in vitro* associada à aspiração folicular por ultrassonografia. Dentro desse contexto, este documento tem o objetivo de apresentar a técnica de transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) em bovinos, que surge como uma terceira opção para a produção de embriões. Essa técnica associa as vantagens da produção *in vivo* e da produção *in vitro*, gerando grande número de embriões sem o uso de hormônios e sem a necessidade de utilizar estruturas e condições laboratoriais. Com isso, pretende-se que este material sirva para esclarecer estudantes, técnicos e produtores sobre os procedimentos, as vantagens e potenciais aplicações dessa técnica.

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-geral
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sumário

Introdução	08
Metodologia da TIFOI	09
Materiais.....	10
Sincronização do estro da ovuladora.....	11
Aspiração folicular ou <i>ovum pick up</i> (OPU).....	12
Injeção dos ovócitos imaturos.....	12
Inseminação artificial (IA).....	13
Coleta dos embriões.....	13
Transferência ou congelamento dos embriões.....	13
Estudos e resultados da TIFOI	14
Experimento 1.....	14
Experimento 2.....	14
Compilação dos resultados.....	17
Considerações finais	17
Referências Bibliográficas	18

Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI): uma Alternativa para Produção de Embriões Bovinos

José Felipe Warmling Spricigo
Margot Alves Nunes Dode

Introdução

No Brasil, foram produzidos em 2015 um total aproximado de 375.000 embriões bovinos (VIANA, 2016). Destes, cerca de aproximadamente 353.000 embriões foram produzidos *in vitro* e 22.000 *in vivo*. Esses dados mostram a demanda pela multiplicação mais rápida e eficiente de animais com uma genética diferenciada.

Atualmente a produção de embriões *in vivo* por superovulação (SOV) e a produção de embriões *in vitro* (PIVE) são as opções disponíveis para a multiplicação rápida de germoplasma feminino (SALILEW-WONDIM et al., 2015). Apesar da SOV produzir um embrião de excelente qualidade, um intervalo entre protocolos de superovulação de aproximadamente 40 dias deve ser respeitado, pois a utilização do hormônio folículo estimulante (FSH) altera os padrões fisiológicos da dinâmica folicular, diminuindo os resultados das superovulações subsequentes. Já na PIVE, a doadora pode ser submetida à aspiração folicular orientada por ultrassonografia (OPU) para obtenção de ovócitos semanalmente. Porém, a PIVE demanda uma complexa infraestrutura, envolvendo instalações, equipamentos, meios e pessoal especializado, o que encarece o processo, além de produzir embriões de qualidade inferior aos produzidos *in vivo*.

Dessa maneira, a utilização de uma técnica que associe as vantagens da produção *in vivo* com as vantagens da PIVE seria a opção ideal para a multiplicação animal. Nesse contexto, a técnica de transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI), proposta recentemente pelo grupo de reprodução animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (SPRICIGO et al., 2016), surge como uma terceira opção para produção de embriões bovinos. Resumidamente, esta biotecnologia propõe que ovócitos imaturos, obtidos por OPU, possam ser injetados em um folículo dominante que esteja próximo da ovulação em uma vaca receptora dos ovócitos (ovuladora). Neste caso, os processos fisiológicos inerentes à maturação, liberação durante a ovulação, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial ocorrem *in vivo* no organismo da ovuladora. Para tanto, a ovuladora é submetida a um protocolo convencional de indução do estro, semelhante ao utilizado para inseminação artificial em tempo fixo (SPRICIGO et al., 2016). No dia do estro, os ovócitos aspirados da doadora que se quer multiplicar são injetados no folículo dominante da ovuladora, que em seguida recebe uma inseminação artificial (IA) convencional. A vaca ovuladora atua então como uma receptora intermediária, sustentando o desenvolvimento embrionário inicial até o momento da recuperação dos embriões, já no estágio de blastocisto. Os embriões são então coletados e podem ser transferidos para receptoras definitivas, que levarão a gestação a termo, ou podem ser congelados e armazenados em nitrogênio líquido (NL₂).

Dessa forma, a transferência intrafolicular de ovócitos bovinos imaturos permite a produção de embriões *in vivo* a partir de ovócitos aspirados de doadoras selecionadas, possibilitando a multiplicação rápida de fêmeas bovinas em um sistema mais simples, acessível e de menor custo quando comparado aos modelos de produção de embriões utilizados atualmente.

Uma das vantagens da técnica é a não utilização de FSH, deixando a produção de embriões mais barata e menos onerosa fisiologicamente para a doadora. Comparada à produção *in vitro*, a TIFOI poderá ser uma tecnologia mais acessível, uma vez que todos os componentes de laboratório, incluindo instalações, meios e equipamentos de cultivo e transporte de ovócitos e embriões, serão dispensados. Em termos financeiros, o embrião produzido por esta técnica poderá ser em torno de 2 a 3 vezes mais barato do que embriões produzidos *in vivo* por SOV ou *in vitro*. Além disso, esta biotecnologia permitirá a produção do embrião na própria fazenda. Dessa maneira, as potenciais vantagens econômicas serão não apenas para quem produz embriões em larga escala, como é comum no mercado de corte, mas também para o pequeno produtor, típico da pecuária leiteira, que poderá desfrutar das vantagens da aceleração do melhoramento genético de seus animais.

O desenvolvimento desta biotecnologia resulta em uma terceira opção para a produção de embriões bovinos. Esta provavelmente não substituirá os sistemas atuais, porém servirá como alternativa simples e de baixo custo para a multiplicação de fêmeas bovinas.

O presente documento tem o objetivo de apresentar e descrever a técnica de transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) e também relatar resultados e perspectivas obtidos com a técnica pelo Laboratório de Reprodução Animal (LRA) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Metodologia da TIFOI

A TIFOI consiste na obtenção de ovócitos imaturos de vacas doadoras, por meio da OPU, seguida pela transferência deles para o folículo pré-ovulatório de uma vaca previamente sincronizada no dia do estro. Condições como um diâmetro folicular superior a 10 mm e o momento da injeção devem ser levados em consideração para garantir aos ovócitos um tempo adequado de maturação neste ambiente folicular. Após a injeção, deve-se realizar a IA. A última etapa da técnica compreende a lavagem uterina, 8 dias após a injeção/inseminação, finalizando com a recuperação dos embriões. A sequência de realização da TIFOI está representada na Figura 1, e cada uma das etapas é descrita a seguir.

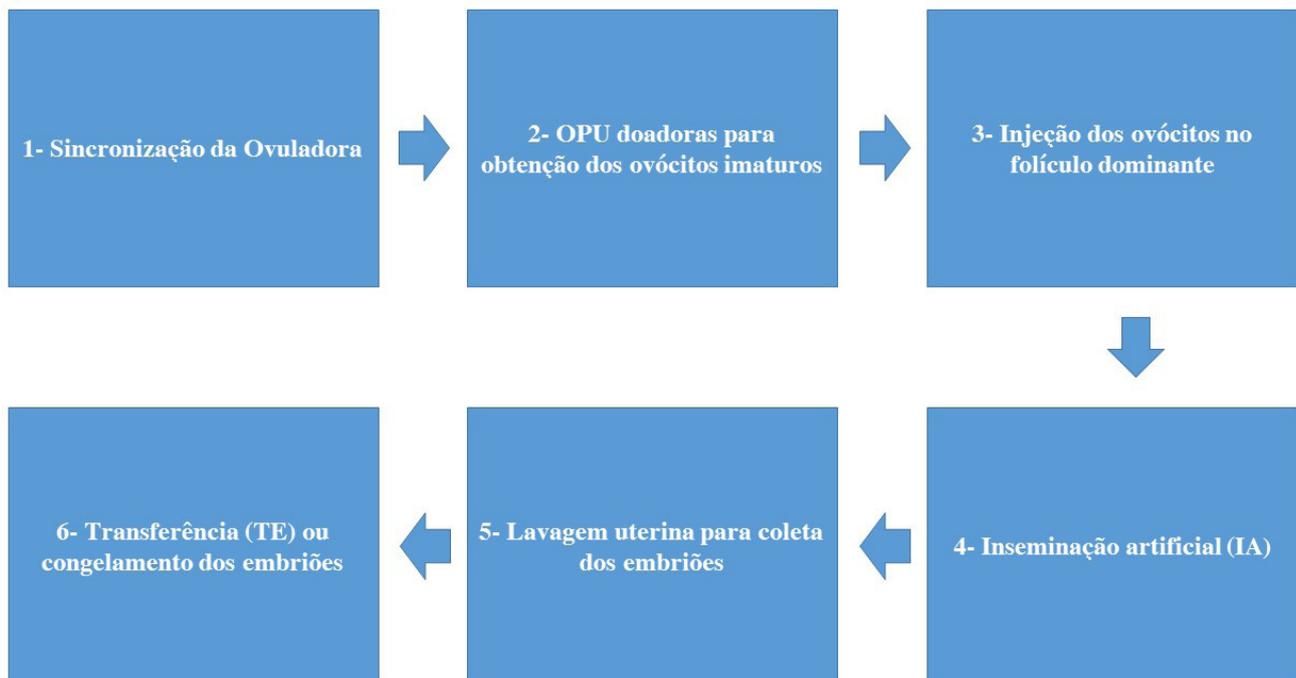


Figura 1. Esquema representativo da sequência e técnicas necessárias para a realização da TIFOI.

Materiais

Hormônios

- Implante de progesterona
- Benzoato de estradiol
- Análogo da Prostaglandina F_{2α} (d-Cloprostenol)
- Análogo de GnRH (bucelrelina)

Material OPU

- Guia de aspiração
- Ultrassom com probe intravaginal microconvexa de 7,5 mHz
- Sistema de aspiração e agulhas 18 a 20 G
- Bomba para vácuo
- Placas de petri e tubos cônicos
- Estereomicroscópio
- Meio de aspiração (PBS + Soro Fetal + Heparina + Antibiótico)

Material para injeção de ovócitos (Figura 2)

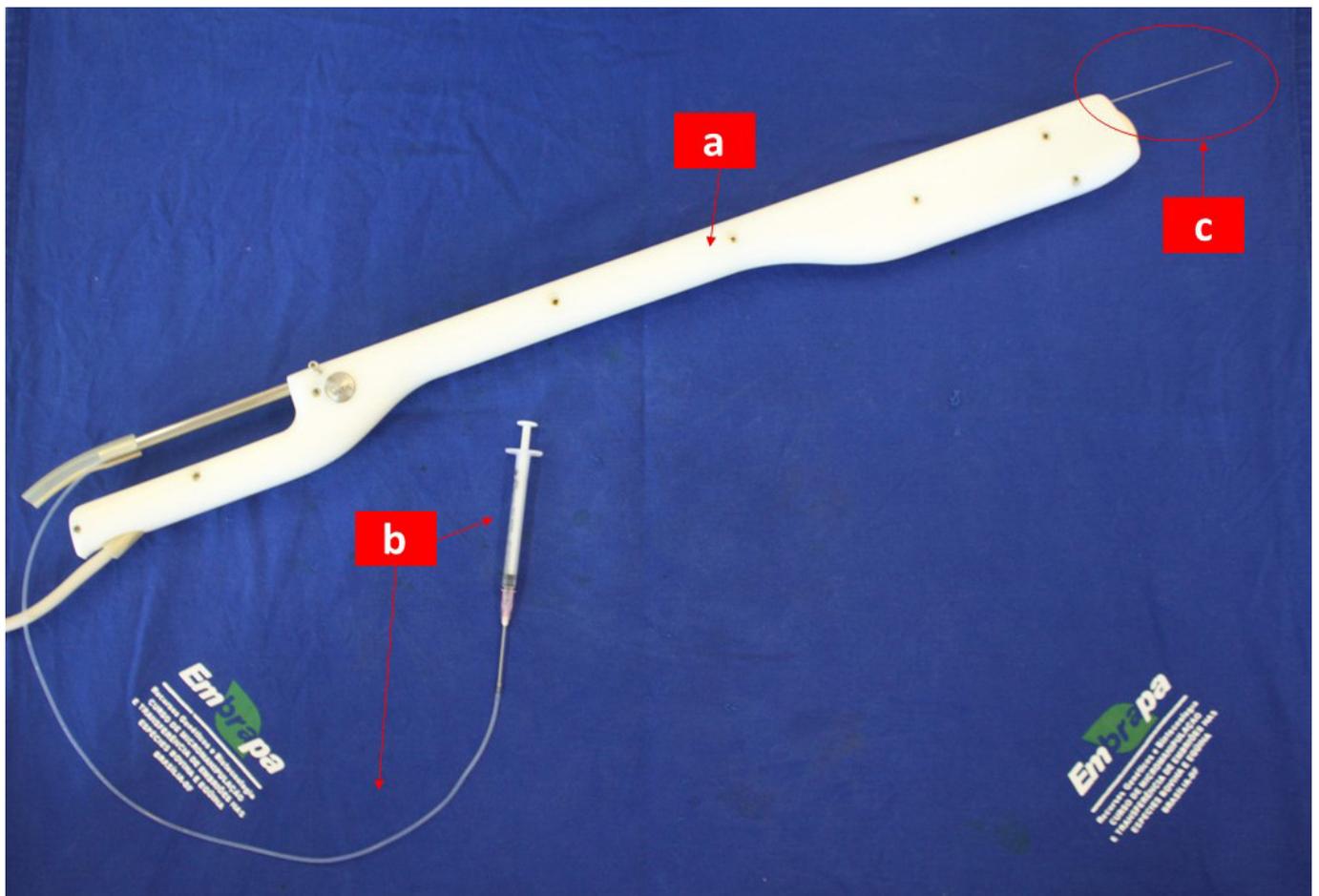


Figura 2. Fotografia do sistema de injeção de ovócitos, contendo a guia de aspiração (a); o sistema e seringa de injeção (b); e a agulha 27 G usada para a injeção (c).

- Guia de aspiração
- Ultrassom com probe intravaginal microconvexa de 7,5 MHz
- Sistema de injeção contendo em uma extremidade uma seringa de insulina (1,0 mL)
- Agulha de injeção (27 G) acoplada a outra extremidade do sistema de injeção
- Líquido folicular

Material para inseminação artificial

- Palheta de sêmen
- Aplicador de sêmen
- Bainha de inseminação
- Descongelador de sêmen ou banho-maria

Material para coleta dos embriões

- Sistema de coleta
- Filtro coletor
- Sonda de *foley*
- Mandril para sonda
- PBS
- Estereomicroscópio
- Placas de petri

Material para transferência dos embriões e congelamento clássico

- Inovulado
- Bainha de TE
- Meio *Holding*
- Camisinha sanitária
- Equipamento de congelação
- Etileno glicol (1,5 M)
- NL_2
- Palhetas de 0,25 mL

Sincronização do estro da ovuladora

A sincronização do estro tem como objetivo induzir o animal ao estro no período desejado, de forma que ele apresente um único folículo dominante (pré-ovulatório) no momento da injeção dos ovócitos. Diferentes protocolos podem ser utilizados; o descrito neste documento é o protocolo utilizado pelo LRA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A sincronização é iniciada no dia -10 (D-10 em relação ao dia marcado para realizar a TIFOI), com a inserção vaginal do implante de progesterona (1 g), associada à aplicação (i.m.) de 2 mg de Benzoato de Estradiol. No dia -2, deve-se aplicar (i.m.) um análogo de Prostaglandina $F_{2\alpha}$ (0,150 mg de d-Cloprostenol) juntamente com a remoção do implante, e no dia -1, faz-se a administração de 1 mg de Benzoato de Estradiol (i.m.). O dia 0 (D0) será o dia da injeção dos ovócitos e inseminação artificial. O protocolo utilizado está ilustrado na Figura 3.

Independentemente do protocolo, este deve garantir a formação de um único folículo dominante maior que 10 mm de diâmetro. É importante ressaltar que quando este protocolo é utilizado, ou seja, a TIFOI é realizada entre 52-54 horas após a retirada do implante, a ovulação ocorrerá em aproximadamente 15 a 18 horas (aproximadamente 65 horas após a retirada do implante). A utilização de protocolos diferentes requer novas avaliações, com o acompanhamento do momento da ovulação.

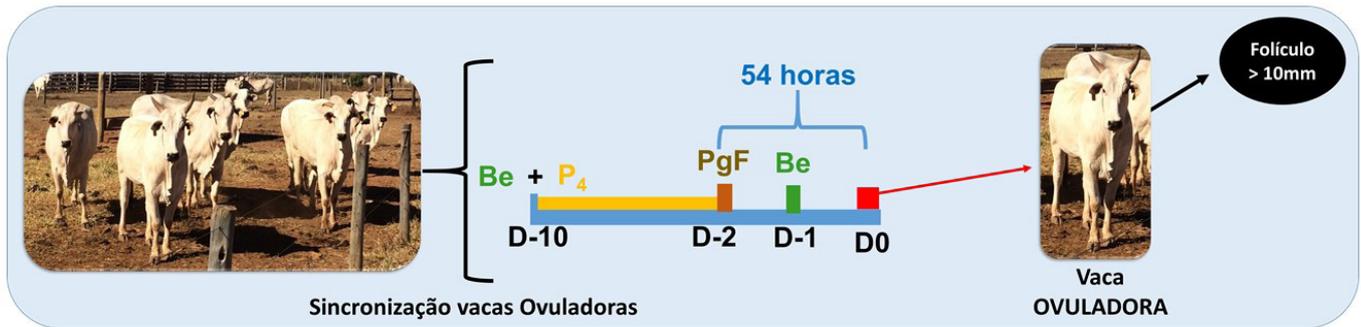


Figura 3. Ilustração do protocolo hormonal utilizado para a sincronização de vacas ovuladoras para a transferência intrafolicular de ovócitos imaturos – TIFOI.

Aspiração folicular ou *ovum pick up* (OPU)

Os ovócitos imaturos são obtidos pela técnica de aspiração folicular (MOROTTI et al., 2014; PONTES et al., 2011). Primeiramente, os animais são contidos em tronco apropriado para bovinos e, após a antisepsia local, deve-se realizar uma anestesia epidural baixa. Para a OPU, a guia deve ser posicionada no fórnix vaginal, e direcionada para o mesmo lado do ovário a ser aspirado (direito/esquerdo). Os ovócitos serão aspirados em PBS (*Phosphate buffered saline*) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino e 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de heparina sódica, em temperatura de 36°C. A pressão de aspiração utilizada deve garantir um fluxo do aspirado entre 13 a 15 mL/min. Para a aspiração, é utilizado um aparelho de ultrassom equipado com uma probe intravaginal micro convexa de 7,5 MHz montada em um suporte-guia para agulha de aspiração (calibres 18 a 20 G), uma bomba de vácuo e um circuito de aspiração. O aspirado folicular deve ser lavado em filtros de malha de 80 μm para remoção de hemácias. Os complexos *cumulus*-ovócito (CCOs) encontrados são submetidos ao processo de seleção em estereomicroscópio.

Injeção dos ovócitos imaturos

A injeção dos ovócitos deve acontecer entre 48 a 56 horas após a retirada do implante de progesterona. Para a injeção dos CCOs imaturos, os animais devem ser contidos em tronco apropriado, e após a antisepsia local deve-se realizar anestesia epidural baixa com lidocaína a 2%. Para a injeção, é necessária uma guia transvaginal semelhante à utilizada no procedimento de OPU. Na guia transvaginal deve estar acoplado um mandril, montado com um sistema fechado, contendo em uma das extremidades uma seringa de insulina, e na outra extremidade uma agulha calibre 27 G. Os ovócitos imaturos devem ser alocados por pressão negativa, dentro da agulha junto com líquido folicular, em um volume final de 60 μL . Todo o sistema deverá ser previamente preenchido com PBS, lembrando a importância da manutenção de uma coluna de ar de aproximadamente 1 cm entre o líquido folicular e o PBS do sistema. A guia será então posicionada no fórnix vaginal e direcionada para o mesmo lado do ovário contendo o folículo dominante. A agulha perfurará o fórnix e a parede do folículo e, logo após, será injetado todo o volume do meio contendo os CCOs (Figura 4).

Para assegurar a ovulação em um prazo de 24 horas, o ideal é que seja realizada a administração de um análogo do GnRH. É importante ressaltar que a quantidade de ovócitos passíveis de serem injetados em cada folículo ovulatório ainda não está bem definida (experimentos em andamento); logo, recomenda-se que sejam injetados os ovócitos obtidos em cada seção de OPU. Em nosso laboratório, diferentes quantidades já foram utilizadas. No experimento em que foram obtidos os nascimentos dos bezerros Gir, por exemplo, foram injetados aproximadamente 25 ovócitos (SPRICIGO et al., 2016). Atualmente está sendo avaliada a injeção de diferentes quantidades (10, 25 e 50 ovócitos). Para ovócitos maturados *in vitro*, Kassens et al. (2015) utilizaram a injeção de 60 estruturas.

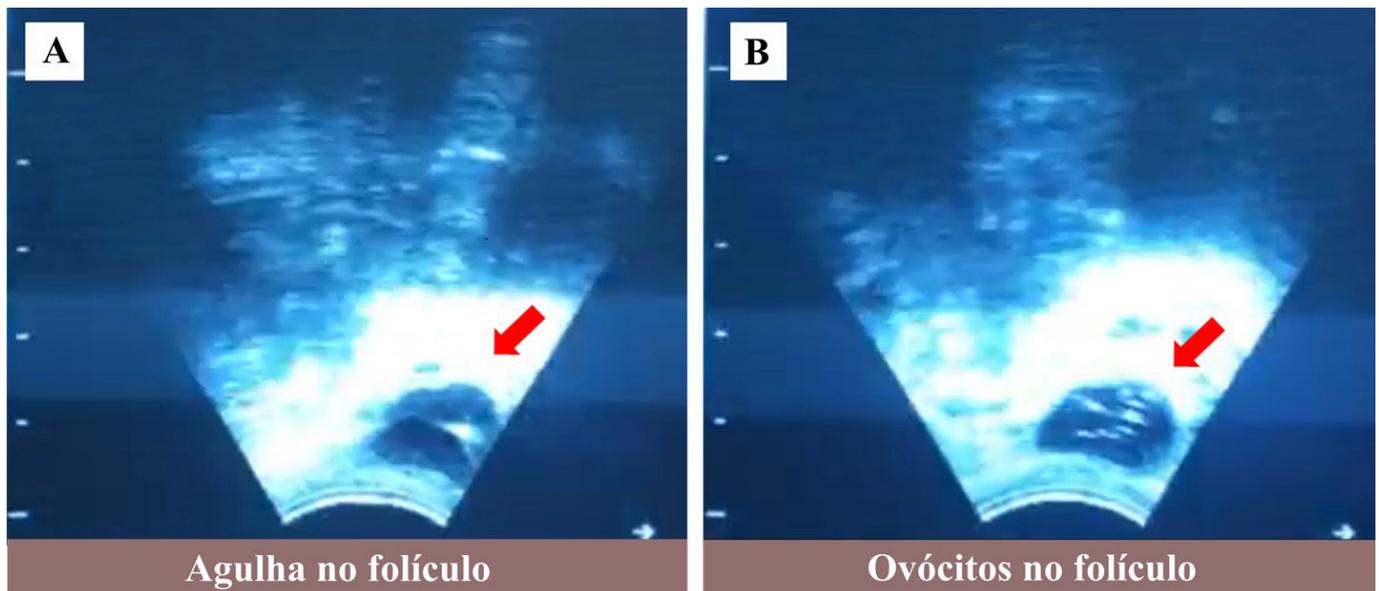


Figura 4. (A) Imagem de ultrassom do folículo dominante no momento da injeção. A seta vermelha indica o folículo (anecoico) e a agulha (hiperecoico); (B) folículo dominante indicado pela seta vermelha, com pontos hiperecoicos, os ovócitos injetados.

Inseminação artificial (IA)

A inseminação artificial pode ser realizada logo após a injeção dos ovócitos. Porém, experimentos em andamento ainda buscam definir o melhor horário para a realização da inseminação. De maneira resumida, após o descongelamento de uma palheta de sêmen, deve-se montar o aplicador, realizar a transposição da cérvix e aplicar o sêmen no corpo uterino. Todavia, o ideal é que o aplicador seja direcionado ao corno uterino ipsilateral ao ovário com o folículo dominante. A inseminação artificial pode, teoricamente, ser realizada com sêmen sexado, porém ainda não se tem dados referentes ao uso desse tipo de sêmen (experimentos em andamento).

Coleta dos embriões

Após a fecundação, o tempo de desenvolvimento para que o embrião atinja o estágio de blastocisto é de aproximadamente 7 dias. Como o objetivo de recuperar o embrião nesse estágio, a lavagem uterina deve ser realizada 8 dias após a injeção dos ovócitos. Antes do início do procedimento de coleta, é importante a realização de ultrassonografia para a avaliação do corpo lúteo (CL) e confirmação de que a ovulação ocorreu realmente, e no ovário onde havia o folículo dominante no momento da injeção. Para a lavagem uterina e coleta dos embriões, os animais devem ser contidos e, após a antissepsia, deve-se realizar anestesia epidural baixa com lidocaína 2%. A coleta é realizada por via transcervical; para tanto, uma sonda de *foley* de número 18 ou 20 pode ser utilizada para a lavagem uterina com PBS aquecido a 30°C. Por gravidade, o PBS é removido do útero, passando por um filtro de malha de 80 μm . Após a busca em um estereomicroscópio, os embriões recuperados devem ser avaliados quanto à qualidade morfológica (IETS) e classificados quanto ao estágio de desenvolvimento em mórula (Mo), mórula compacta (Mc), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (BI) ou blastocisto expandido (Bx). Para a correta interpretação dos resultados, recomenda-se que um embrião seja descontado do total recuperado. Esta prática evita a contagem de um possível embrião resultante da ovulação do ovócito da própria ovuladora.

Transferência ou congelamento dos embriões

Após a classificação, os embriões poderão ser transferidos para receptoras previamente sincronizadas em D6, D7 ou D8 (dias após o estro). Uma característica importante da TIFOI é que animais remanescentes da sincronização prévia que não foram utilizados como ovuladores podem ser utilizados como receptoras. Diferentes protocolos podem ser utilizados para a sincronização. O LRA da Embrapa Recursos Genéticos

e Biotecnologia utiliza o mesmo protocolo já descrito para ovuladoras. No dia da transferência, os animais contidos devem ser avaliados quanto à presença e qualidade do CL. Na sequência, realiza-se a antisepsia e a anestesia epidural baixa com lidocaína 2%. Os embriões são então alocados em palhetas de 0,25 mL em meio de manutenção (*holding*), montadas no inovulador e transferidas para o terço final do corno uterino ipsilateral ao CL. Outra opção é a realização do congelamento destes embriões. Atualmente a vitrificação (MORATO et al., 2010) e o congelamento clássico seriam as opções para a criopreservação (SARAGUSTY et al., 2011). Porém, entre os principais objetivos da TIFOI está, além da produção de um embrião de boa qualidade, a simplificação dos processos de disseminação de material genético. Tomando isso por premissa, assume-se que o congelamento clássico seria atualmente a melhor opção para a criopreservação, principalmente pelo fato de permitir a transferência direta do embrião após descongelamento (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 1997). Experimentos estão sendo realizados para comparar a criotolerância de embriões produzidos por TIFOI ou *in vitro* (PIVE), utilizando-se o congelamento clássico.

Estudos e resultados da TIFOI

A TIFOI é uma técnica ainda em desenvolvimento que foi lançada em novembro de 2016 pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília-DF). A exemplo de outras biotecnologias, os resultados obtidos nessa fase inicial muitas vezes não são satisfatórios para o uso comercial. Entretanto, a expectativa é de que, com o aprimoramento da técnica e conseqüente aumento nos índices, esta se torne mais eficiente, viabilizando seu uso comercial, a exemplo do que ocorreu com a PIVE, na qual o primeiro animal produzido no Brasil nasceu em 1994 (PEIXER et al., 1994) mas o primeiro laboratório comercial só foi estabelecido no final da década de 1990 (VIANA et al., 2012).

A eficiência da técnica pode ser mensurada pela razão entre o número de embriões viáveis recuperados e o número de ovócitos injetados. É importante ressaltar que, para efeito de cálculo, deve-se retirar um embrião do total recuperado, pois assume-se que esse embrião possa ser oriundo do ovócito intrínseco da vaca ovuladora. Como exemplo, tem-se uma vaca ovuladora da qual recuperam-se 5 embriões, após a exclusão de 1 (potencialmente da própria ovuladora), tem-se 4 embriões extras. Se nesse animal fosse realizada a injeção de 20 ovócitos, pode-se concluir que a eficiência seria de 20% (4/20). Tomando a recuperação de embriões como parâmetro, pode-se afirmar que atualmente a TIFOI tem cerca de 10-12% de eficiência. Entre os prováveis fatores responsáveis por esses resultados, pode-se citar a baixa recuperação de estruturas após a lavagem uterina (40%). Cerca de 70-80% das estruturas recuperadas são classificadas como fecundadas (ou seja, a taxa de estruturas não fecundadas é de apenas 20-30%). Assim, pode-se inferir que aumentando a taxa de recuperação de estruturas a eficiência da técnica também aumentará.

Na sequência, são apresentados alguns resultados obtidos com a técnica até o presente. Todavia, vale ressaltar que todos os resultados foram alcançados em modelos experimentais.

Experimento 1

A proposta da TIFOI surgiu pela necessidade de se ter um sistema *in vivo* para a manutenção e o desenvolvimento de ovócitos após a criopreservação. Neste experimento, comparou-se a produção embrionária após a TIFOI utilizando-se ovócitos frescos ou vitrificados. Para ovócitos frescos, foram realizadas 11 injeções, com uma média aproximada de 22 ovócitos por injeção, enquanto que para ovócitos vitrificados 9 injeções foram realizadas com a mesma média de ovócitos (SPRICIGO et al., 2016). De forma resumida, os resultados estão apresentados na Figura 5.

Experimento 2

Neste experimento, buscou-se produzir embriões TIFOI a partir de ovócitos imaturos obtidos por OPU de vacas Gir (SPRICIGO et al., 2016). O objetivo foi avaliar a qualidade dos embriões produzidos, observando se seria possível a obtenção de gestações e de bezerros saudáveis após a TE. Foram realizadas 6 sessões de

OPU para a obtenção dos ovócitos imaturos. Após seleção, os ovócitos (grupos de 20-25) foram utilizados para TIFOI em vacas ovuladoras da raça Nelore. Após 8 dias da injeção e inseminação com sêmen de touro da raça Gir, as vacas ovuladoras foram submetidas a lavagem uterina para obtenção dos embriões. Os embriões produzidos (Tabela 1) foram transferidos individualmente para receptoras sincronizadas. Os resultados estão descritos na Figura 5.

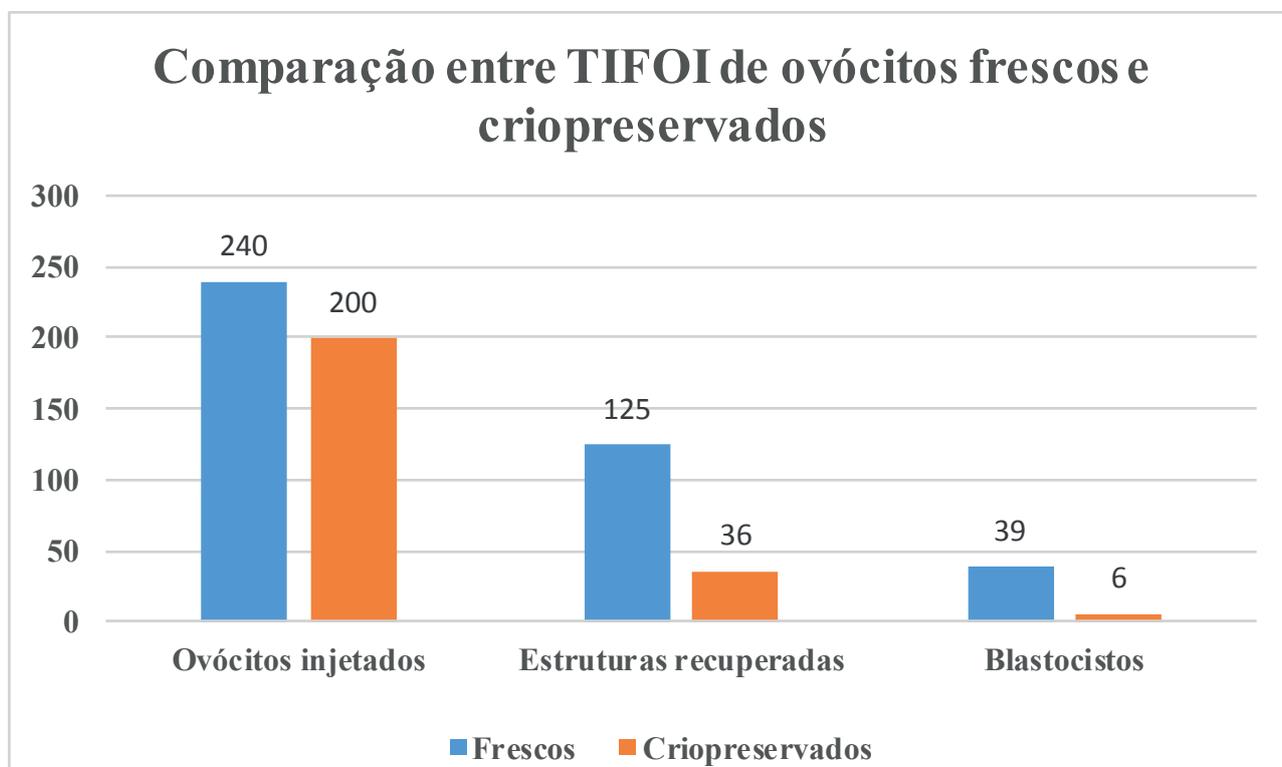


Figura 5. A produção de embriões para os grupos que foram submetidos à TIFOI foi calculada considerando-se o total de estruturas recuperadas após a lavagem uterina. A produção de blastocistos em D7 foi mais elevada ($P < 0,05$) no grupo fresco (16%, barra azul) em comparação a TIFOI com ovócitos vitrificados (3%, barra laranja). Neste experimento, não foi descontado o embrião das ovuladoras; caso fosse, a produção de embriões após TIFOI de ovócitos vitrificados seria de 0%, e de ovócitos frescos de 11,6%.

Tabela 1. Número de ovócitos injetados, estágio de desenvolvimento das estruturas recuperadas, número e porcentagem de estruturas recuperadas (D7), recuperação total e porcentagem de recuperação depois da exclusão do ovócito incluso no foliculo da receptora, em cada injeção.

Número de ovócitos	Recuperação (D7)						Recuperação total (D7)				Embriões Extra (D7)*				
	NF	Dg	Mc	Bi	Bl	Bx	Estruturas		Embriões		Estruturas		Embriões		
							N	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
22	2					1	3 (13.6)	1	(33.3)	2	(9.1)	0	(0.0)		
22	1	5		1			7 (31.8)	1	(14.3)	6	(27.3)	0	(0.0)		
10			1			2	3 (30.0)	3	(100.0)	2	(20.0)	2	(66.7)		
10							0 (0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)		
22		6		1			7 (31.8)	1	(14.3)	6	(27.3)	0	(0.0)		
22		3				5	8 (36.4)	5	(62.5)	7	(31.8)	4	(50.0)		
Total	108	3	14	1	2	0	8	28	(25.9)	11	(39.3)	23	(21.3)	6	(26.1)

* Embriões após a exclusão de 1 possivelmente da ovuladora.

Os embriões produzidos neste experimento foram transferidos, e os resultados de gestação encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Diagnóstico de gestação e nascimento de embriões produzidos pela técnica de TIFOI, de acordo com o estágio de desenvolvimento e a classificação embrionária e com a injeção de referência.

Transferência	Referência da injeção	Embrião (qualidade)	Gestações*	Nascimento
1	1	Bi (2)	-	
2	2	Bx (1)	-	
3	3	Bx (1)	-	
4	3	Bx (1)	-	
5	3	Mc (1)	+	+
6	6	Bx (1)	-	
7	6	Bx (1)	+	+
8	6	Bx (1)	+	+
9	6	Bx (1)	+	+
10	6	Bx (1)	-	
11	5	Bi (2)	-	

* Diagnóstico realizado 53 dias após a transferência.

Todas as gestações vieram a termo com o nascimento de 4 bezerros (Figura 6). Entre os bezerros nascidos, um foi originado a partir do ovócito da ovuladora, conforme identificado pelo fenótipo típico de animal meio-sangue e também por teste de paternidade por exames de DNA realizado pela empresa Geneal Diagnósticos LDTA (Uberaba-MG). Os demais foram produzidos a partir dos ovócitos de doadoras Gir utilizadas na TIFOI.



Figura 6. Primeiros bezerros produzidos pela técnica de TIFOI-TE. Da esquerda para direita, tem-se um macho TIFOI, uma fêmea não TIFOI (1/2 sangue Nelore-Gir) seguida por duas fêmeas TIFOI.

Compilação dos resultados

Com o objetivo de sumarizar os resultados, a Tabela 3 traz a compilação de alguns dos resultados obtidos nos diferentes experimentos realizados até o presente momento.

Tabela 3. Compilação dos resultados obtidos em diferentes experimentos com a técnica de transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI).

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Geral (soma 3 experimentos)
Número de vacas	22	16	30	68
Procedência dos ovócitos	Frigorífico	Frigorífico	OPU (Gir e HOL)	-
Média de ovócitos injetados	28	25	16	23
Média diâmetro folicular (mm)	11.2	12.6	12.6	12.1
Média irrigação folicular (escala de 1-5)	1.7	1.5	2.1	1.8
Porcentagem (%) de vacas que não ovularam	27%	18%	0%	15.0%
Média diâmetro CL (mm)	14.5	19.5	18.4	17.5
Média irrigação CL (escala de 1-5)	3.7	4.4	4.4	4.2
Frequência de ovulação OD (%)	66%	53%	56%	58.3%
Total de ovócito injetados	620	400	479	1499
Porcentagem (%) de animais dos quais não foi recuperada nenhuma estrutura	31%	15%	10%	18.7%
Porcentagem (%) de animais dos quais foram recuperadas 1 ou mais estruturas	56%	92%	76%	74.8%
Total de estruturas recuperadas	175	126	180	481
Porcentagem (%) de estruturas recuperadas	28.20%	31.50%	37.50%	32.4%
Porcentagem (%) de estruturas recuperadas (excluindo as vacas que não ovularam)	36.80%	38.80%	37.50%	37.7%
Número de embriões recuperados	33	40	60	133
Porcentagem (%) de embriões recuperados	5.30%	10.00%	12.50%	9.3%
Porcentagem (%) de embriões recuperadas (excluindo as vacas que não ovularam)	6.90%	12.30%	12.50%	10.6%
Número de estruturas fecundadas (embriões + degenerados)	140	95	143	378
Porcentagem (%) de estruturas fecundadas (embriões + degenerados)/total injetado	22.60%	23.80%	29.90%	25.4%
Porcentagem (%) de estruturas fecundadas (embriões + degenerados)/recuperadas	80.00%	75.40%	79.40%	78.3%

Considerações finais

A TIFOI é uma tecnologia com potencial para ser uma opção comercial para a produção de embriões bovinos, assim como já ocorre com biotecnias como a SOV e a PIVE. Ela também pode vir a servir de modelo para a produção de embriões em outras espécies, inclusive em animais silvestres. Entre as vantagens da técnica, destacam-se: a não utilização de hormônios para a estimulação de múltiplas ovulações; a produção de embriões totalmente in vivo e, portanto, de melhor qualidade; a possibilidade de se usar a doadora semanalmente; a não necessidade de meios, equipamentos e infraestrutura laboratorial; e a valorização do médico veterinário e do produtor.

Todavia, sabe-se que para comprovar o potencial de uma biotecnologia para uso comercial, além da prova de conceito, é preciso que ela apresente uma logística executável e resultados satisfatórios. Entre estas premissas, a TIFOI atualmente atende as duas primeiras. Como foi mostrado neste documento, a técnica é capaz de produzir embriões viáveis e bezerras saudáveis e apresenta uma boa logística, pois todo o processo é realizado na fazenda, e os animais sincronizados que não são utilizados como ovuladoras podem ser aproveitados como receptoras dos embriões em D7. Por fim, em relação ao último quesito, a eficiência ainda precisa ser melhorada. Contudo, assim como ocorreu com outras biotecnias, acredita-se que a progressiva disseminação da TIFOI ajudará a superar os gargalos e melhorar os resultados.

Referências

- KASSENS, A.; HELD, E.; SALILEW-WONDIM, D.; SIEME, H.; WRENZYCKI, C.; TESFAYE, D.; SCHELLANDER, K.; HOELKER, M. Intrafollicular Oocyte Transfer (IFOT) of abattoir-derived and in vitro-matured oocytes results in viable blastocysts and birth of healthy calves. **Biology of Reproduction**, v. 92, p. 150, 2015.
- MORATO, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M. T.; MOGAS, T. Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of in vitro-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. **Reproduction Fertility and Development**, v. 22, p. 1141-1147, 2010.
- MOROTTI, F.; SANCHES, B. V.; PONTES, J. H.; BASSO, A. C.; SIQUEIRA, E. R.; LISBOA, L. A.; SENEDA, M. M. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. **Theriogenology**, v. 81, p. 696-701, 2014.
- PEIXER, M. A.; SOUZA, R. V.; RUMPF, R.; DE BEM, A. R.; NETO, M. A. P. Nascimento dos primeiros produtos de FIV da raça Nelore no Cenargen. **Zootecnia**, v. 32, p. 49, 1994.
- PONTES, J. H.; MELO STERZA, F. A.; BASSO, A. C.; FERREIRA, C. R.; SANCHES, B. V.; RUBIN, K. C.; SENEDA, M. M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, p. 1640-1646, 2011.
- SALILEW-WONDIM, D.; FOURNIER, E.; HOELKER, M.; SAEED-ZIDANE, M.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; NEUHOFF, C.; BESENFELDER, U.; HAVLICEK, V.; RINGS, F.; GAGNE, D.; SIRARD, M. A.; ROBERT, C.; SHOJAEI SAADI, H. A.; GAD, A.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Genome-Wide DNA Methylation Patterns of Bovine Blastocysts Developed In Vivo from Embryos Completed Different Stages of Development In Vitro. **PLoS One**, v. 10, p. e0140467, 2015.
- SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v. 141, p. 1-19, 2011.
- SPRICIGO, J. F.; SENA NETTO, S. B.; MUTERLLE, C. V.; RODRIGUES SDE, A.; LEME, L. O.; GUIMARAES, A. L.; CAIXETA, F. M.; FRANCO, M. M.; PIVATO, I.; DODE, M. A. Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 86, p. 2054-2062, 2016.
- VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M.; DEN DAAS, J. H.; RALL, W. F. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. **Theriogenology**, v. 48, p. 1071-1084, 1997.
- VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHAO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 1, p. 12-18, 2012.
- VIANA, J. H. Produção de embriões bovinos em 2014 e 2015: reflexos de um período de turbulências. **O Embrião**, v. 58, n. 2, p. 6-8, 2016.



***Recursos Genéticos e
Biotecnologia***