



ISSN 0102 - 0110

Dezembro, 2002

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

## **Documentos 84**

# **Injeção Intracitoplasmática de Células Espermáticas e suas Aplicações na Reprodução dos Bovinos**

Carlos Frederico Martins  
Antonio Emídio Dias Feliciano Silva  
Rodolfo Rumpf

Brasília, DF  
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF  
CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372  
PABX: (61) 448-4600  
Fax: (61) 340-3624  
<http://www.cenargen.embrapa.br>  
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias  
Secretária-Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual  
Membros: Antônio Costa Allem  
          Marcos Rodrigues de Faria  
          Marta Aguiar Sabo Mendes  
          Sueli Correa Marques de Mello  
          Vera Tavares Campos Carneiro  
Suplentes: Edson Junqueira Leite  
          José Roberto de Alencar Moreira  
Supervisor Editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual  
Revisor de texto: Miraci de Arruda Camara Pontual  
Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi  
Tratamento de Ilustrações: Alysson Messias da Silva  
Editoração Eletrônica: Alysson Messias da Silva  
Capa: Alysson Messias da Silva

**1ª edição**

1ª impressão (2002): tiragem 150

**Todos os direitos reservados.**

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

---

Martins, Carlos Frederico.

Injeção intracitoplasmática de células espermáticas e suas aplicações na reprodução dos bovinos / Carlos Frederico Martins, Antônio Emídio Dias Feliciano Silva, Rodolfo Rumpf - Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002.

39 p. - (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 0102-0110; n. 84).

1.Injeção intracitoplasmática (ICSI). 2.Células espermáticas  
3.Reprodução 4.Bovinos 5.Fecundação *in vitro* I.Silva, Antônio Emídio Dias Feliciano, II.Rumpf, Rodolfo III.Título IV.Série

CDD 636

---

© Embrapa 2002

# **Autores**

**Carlos Frederico Martins**

Méd. Vet. M.Sc., Doutorando, UnB - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

**Antonio Emídio Dias Feliciano Silva**

Méd. Vet. PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

**Rodolfo Rumpf**

Méd. Vet. PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

# Sumário

<b>Introdução</b> .....	7
<b>Evolução Histórica da Microinjeção de Células Espermáticas</b> .....	8
Injeção intracitoplasmática de espermatozóides .....	8
Injeção Intracitoplasmática de Espermátides .....	10
<b>Procedimentos para Realização da Microinjeção Intracitoplasmática de Células Espermáticas na Espécie Bovina</b> .....	11
Material Biológico .....	11
Equipamentos .....	13
Fabricação das ferramentas de microinjeção .....	13
Preparação dos ovócitos para a injeção .....	15
Preparação dos espermatozóides do epidídimo e ejaculado para a microinjeção .....	15
Ajuste geral do micromanipulador .....	16
Preparação da placa de manipulação de ICSI .....	17
Procedimentos para microinjeção .....	17
Ativação dos ovócitos microinjetados .....	19
<b>Fatores que Influenciam a Técnica de ICSI</b> .....	20
<b>Aplicações da Microinjeção de Células Espermáticas</b> .....	23
<b>A Experiência da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia com Técnica de Microinjeção de Células Espermáticas</b> .....	25
<b>Considerações Finais e Perspectivas Futuras</b> .....	30
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	23

# Injeção Intracitoplasmática de Células Espermáticas e suas Aplicações na Reprodução dos Bovinos

---

*Carlos Frederico Martins*

*Antonio Emídio Dias Feliciano Silva*

*Rodolfo Rumpf*

## Introdução

Com o rápido avanço e desenvolvimento da técnica de fecundação *in vitro* (FIV) em mamíferos e em humanos, em conjunto com a transferência de embriões, houve um aumento na procura por alternativas para contornar os casos em que a adesão dos gametas não é possível quando a FIV convencional é utilizada. Esses casos podem ser devido à várias razões, especialmente infertilidade adquirida ligada ao gameta masculino e mesmo o feminino (TROUNSON et. al., 1998).

Como uma das ferramentas fundamentais de estudos para correção da infertilidade ligada ao espermatozóide, surge a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (*intracytoplasmic sperm injection*, ICSI). Esta técnica representa o processo de inserção mecânica de um espermatozóide inteiro ou do núcleo espermático isolado (cabeça) dentro do *ooplasma* (GOTO et al., 1990). Posteriormente, a técnica de ICSI adquiriu variações quanto ao tipo de células germinativas masculinas microinjetadas, onde destaca-se as espermátides redondas e espermátides alongadas, as quais também possuem potencial fecundante.

No início, as tentativas de injeções de espermatozóides conduzidas entre 1965 e 1980 foram para investigar os primeiros eventos da fecundação, tais como fusão de membrana entre gametas homólogos e heterólogos, ativação do

citoplasma do ovócito, e formação de pró-núcleos femininos e masculinos em roedores e espécies não mamíferas (IRITANI, 1991).

Atualmente, há uma série de razões para utilizar a injeção de espermatozóides nas espécies mamíferas, principalmente nos animais domésticos. A ICSI pode ser utilizada para propagação direta de espécies domésticas e exóticas (CATT & RHODES, 1995), mas também apresenta outras abordagens importantes, tais como: preservação e multiplicação de material genético de reprodutores raros e valiosos que foram ativamente férteis por longos períodos; possibilidade do uso de machos que estão apresentando dificuldades na coleta de espermatozóides ou produzem quantidades insuficientes para a monta natural, inseminação artificial ou fecundação *in vitro*; uso de espermatozóides testiculares e epididimais em caso de morte acidental do reprodutor; uso de células espermáticas de bancos de germoplasma (TROUNSON *et al.*, 1998).

No entanto, a ICSI é uma técnica de recente desenvolvimento na área animal, necessitando de estudos para seu aprimoramento principalmente na espécie bovina, devido ao grande benefício que ela poderá proporcionar para a reprodução animal

Desta forma, acredita-se que um melhor conhecimento da técnica de ICSI, da manipulação das células microinjetadas, e dos processos de fecundação envolvidos, possa garantir uma máxima utilização de animais de alto valor genético. Além disso, o domínio desta técnica poderá incentivar e oferecer mais opções para a recuperação, preservação e multiplicação de material genético raro e em perigo de extinção.

## **Evolução Histórica da Microinjeção de Células Espermáticas**

### **Injeção intracitoplasmática de espermatozóides**

A injeção direta de espermatozóide dentro do citoplasma de um ovócito não é uma inovação recente. A ICSI, a subsequente ativação do ovócito e fecundação têm sido usadas já a alguns anos como uma ferramenta de pesquisa (CATT & RHODES, 1995).

Os primeiros experimentos com microinjeção espermática foram realizados por HIRAMOTO (1962), que injetou espermatozóide de ouriço do mar dentro de um

ovócito da mesma espécie. Neste trabalho inicial o núcleo espermático não descondensou no citoplasma do ovócito. No entanto, quando o ovócito foi inseminado juntamente com a injeção espermática, o núcleo espermático injetado participou do processo meiótico. Este fato sugeriu que a ICSI por si só não promovia a ativação do citoplasma do ovócito e conseqüente descondensação do núcleo espermático, sendo necessário para isto um estímulo acessório.

O primeiro experimento com mamíferos foi conduzido por UEHARA e YANAGIMACHI (1976). Estes pesquisadores aplicaram a técnica de ICSI para determinar se o espermatozóide ou núcleo espermático de hamster injetado dentro de ovócito de hamster pode se desenvolver em pró-núcleo masculino. Esses autores também examinaram se os espermatozóides de várias espécies formariam pró-núcleo quando injetados dentro de ovócitos de hamster. Neste estudo foi observado que o núcleo espermático humano foi capaz de se desenvolver em pró-núcleo quando microinjetados em ovócitos de hamster. Estes dados sugerem que, os fatores citoplasmáticos que controlam a transformação do núcleo espermático em pró-núcleo não são espécie específicos (THADANI, 1980).

Os primeiros estudos em bovinos foram realizados por WESTHUSIN et al. (1984), os quais reportaram a formação de pró-núcleos masculino e feminino após injeção de espermatozóide bovino em ovócitos bovinos maturados *in vitro*. KAMEYAMA et al. (1985), também estudando o processo de fecundação pela técnica de ICSI, reportaram que 13 % dos ovócitos bovinos microinjetados tiveram descondensação de cabeça.

O primeiro produto oriundo de ICSI em mamíferos foi registrado por HOSOI et al. (1988), em coelhos. Posteriormente, GOTO et al. (1990) demonstraram que ovócitos bovinos, maturados *in vitro*, se desenvolveram em blastocistos após terem sido fecundados por injeção de espermatozóide imóvel e considerado "morto" por estarem imóveis, gerando bezerros normais.

Em humanos, a primeira gestação através de ICSI foi obtida em 1992, representando a maior inovação no campo da fecundação assistida na espécie humana (PALERMO et. al., 1992). Desta forma, após o domínio da técnica de fecundação *in vitro*, a ICSI constituiu-se no mais bem sucedido procedimento para a fecundação humana nos casos de severa infertilidade masculina (PALERMO et. al., 1992 e 1993; VAN STEIRTEGHEM et. al., 1993, a e b).

A partir de 1994 a ICSI passou a ser utilizada com sucesso nos casos de oligoastenozoospermia e azoospermia (TOURNAYE et. al., 1994 e SILBER et. al., 1995). Segundo SILBER et. al. (1995), a maioria dos casos de azoospermia hereditária ou adquirida poderia ser tratada com o auxílio das técnicas de aspiração microcirúrgica de espermatozóides do epidídimo. Desta forma, os espermatozóides do epidídimo tem apresentado especial importância porque possui potencial fecundante semelhante aos espermatozóides do ejaculado.

Nos bovinos, da mesma forma que nos humanos, a ICSI com espermatozóides do epidídimo tem apresentado o mesmo potencial que os do ejaculado (GOTO et. al., 1996 e MARTINS et. al., 2001a). No entanto, os espermatozóides do epidídimo têm apresentado maior interesse porque podem ser recuperados de animais que morreram a poucas horas, criopreservados mantendo a funcionalidade para utilização tanto na FIV quanto ICSI (Martins et. al. , 2001b).

## **Injeção Intracitoplasmática de Espermátides**

A espermátide redonda (o mais jovem estágio haplóide) e a alongada, sofrem uma série de profundas modificações estruturais e bioquímicas no testículo antes de se tornar um espermatozóide maduro. Entretanto, desde que o núcleo da espermátide contém um grupo de cromossomos haplóides, pode-se esperar zigotos, quando tais núcleos são introduzidos diretamente dentro do citoplasma dos ovócitos maduros (BARTON et al., 1991).

De fato, OGURA et. al. (1994) reportaram que quando espermátides de camundongo foram eletro-fusionadas com ovócitos, vários embriões desenvolveram-se em camundongos normais. Também, SOFIKITIS et. al. (1994) reportaram que a injeção intracitoplasmática do núcleo de uma espermátide redonda resultou em desenvolvimento embrionário e fetal em coelhos. VANDERZWALMEN et. al. (1995) registram a fecundação, bem sucedida, de um ovócito humano com a microinjeção de espermátide alongada, e FISHEL et. al. (1995) e TESARIK et. al. (1995) registram uma gestação e nascimento de uma criança após ICSI com espermátides. Nos bovinos, os primeiros blastocistos produzidos por ICSI de espermátides foram registrados por GOTO et. al. (1996). Estes pesquisadores também observaram que os blastocistos apresentaram o



mesmo número de células do que aqueles produzidos a partir de espermatozóides maduros.

Em decorrência do tipo celular microinjetado, houve uma mudança do nome da técnica. Nos casos de microinjeção de espermátides redondas, a técnica passou a se chamar de ROSNI (*round spermatid injection*, TESARIK et. al., 1995), e para a injeção de espermátides alongadas ELSI (*elongated spermatid injection*, FISHEL et. al., 1995).

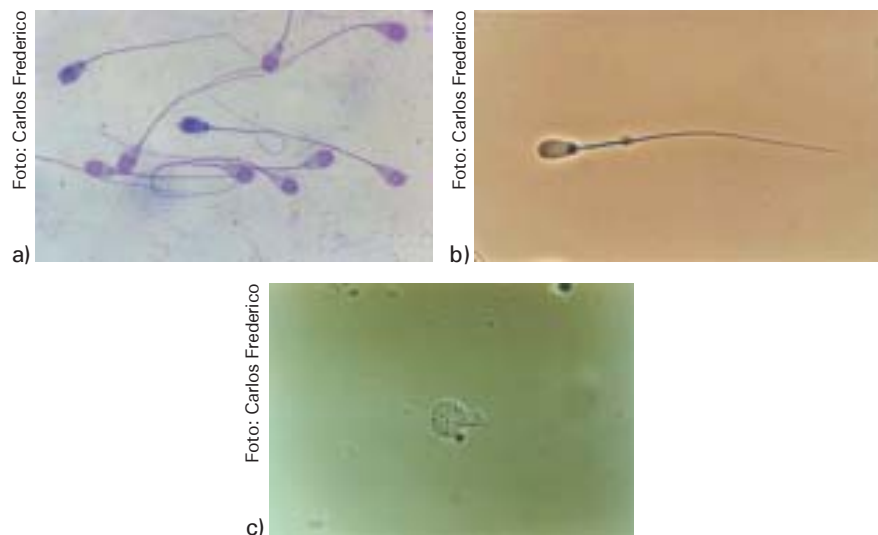
## **Procedimentos para Realização da Injeção Intracitoplasmática de Células Esperáticas na Espécie Bovina**

### **Material Biológico**

#### **Gameta masculino**

A ICSI é uma técnica que permite a utilização de diferentes tipos espermáticos para promover a fecundação, sendo necessário apenas que o núcleo destas células esteja viável. Portanto, é possível utilizar espermatozóides maduros (Fig. 1 a), espermatozóides imaturos (Figura 1b) ou até mesmo células sem diferenciação, como as espermátides (Figura 1c), obtidos respectivamente do ejaculado, do epidídimo e testículo bovino.

Antes da realização da microinjeção é importante verificar o *status* nuclear das células espermáticas. Para tal, no Laboratório de Reprodução Animal (LRA) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, tem sido utilizado a técnica de avaliação da estrutura da cromatina espermática adaptada, de acordo com Martins *et. al.* (2000a). Esta técnica fundamenta-se na utilização de um corante tricíclico heteroaromático, que se intercala a dupla hélice do DNA sob a forma de monômero, ou de agregado quando o DNA encontra-se danificado. A ligação monomérica provoca fluorescência de cor verde (Fig. 2 a), enquanto que a do agregado de cor vermelha (Fig. 2b)



**Fig. 1.** Diferentes tipos de células utilizadas para a microinjeção: a) espermatozoides maduros; b) espermatozoides imaturo c) espermátide em alongamento.



**Fig. 2:** Avaliação da integridade do DNA espermático antes da microinjeção  
a) espermatozoides com cromatina íntegra (verde); b) espermatozoides com cromatina alterada (vermelho).

### Gameta feminino

Os ovócitos a serem microinjetados podem ser obtidos de vacas vivas, através da técnica de *ovum pick-up*, ou provenientes de ovários de animais abatidos em frigoríficos. No entanto, todos ovócitos devem ser maturados *in vitro* (MIV) por um período de 22 horas antes do processo de microinjeção (Fig. 3).

Foto: Carlos Frederico

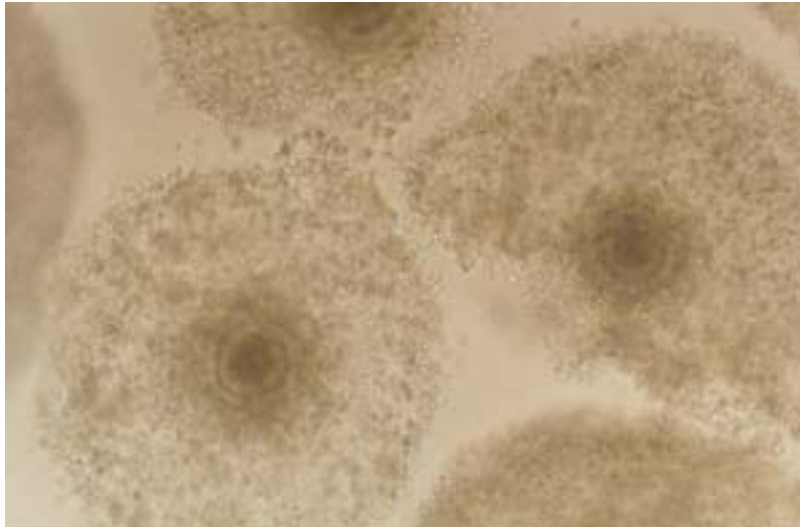


Fig. 3. Ovócitos maturados e rodeados pelas células do cumulus expandidas.

### ***Equipamentos***

Para a realização da microinjeção espermática são necessários equipamentos de precisão. Estes equipamentos serão descritos abaixo, de acordo com a seqüência dos procedimentos da ICSI.

### **Fabricação das ferramentas de microinjeção**

As pipetas são as ferramentas que manipulam os ovócitos e espermatozóides durante o processo de microinjeção, portanto, devem ser confeccionadas com a maior precisão possível para evitar danos às células, bem como dificuldade de manipulação.

Os detalhes e as etapas de preparação das pipetas foram adaptadas aos bovinos durante trabalho realizado no LRA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, modificando-se a metodologia descrita por PAYNE (1995) para os humanos.

#### **A - Fabricação das pipetas de injeção de espermatozóides e espermátides**

Para fazer as pipetas de microinjeção são utilizados capilares de *borosilicato* com paredes finas, apresentando um diâmetro externo (DE) de 1 mm e um interno (DI) de 0.58 mm. Estes capilares são puxados por um aparelho específico

(*Puller*) até atingir um D.E. de de  $7\mu\text{m}$ . Neste processo um filamento de *platinum iridium*, é usado no aparelho puxador de capilar como fonte de emissão de calor, para amolecer homogeneamente o capilar e possibilitar o esticamento no diâmetro adequado.

Os capilares esticados que apresentam paredes paralelas são quebrados onde seu DI é aproximadamente  $6-7\mu\text{m}$ , usando-se a "microforja" (equipamento que apresenta um filamento de metal que se aquece para cortar ou derreter o capilar de borosilicato) marca Narishige, modelo MF- 9. Para este procedimento, uma pequena esfera de vidro aderida ao filamento de *platinum iridium* é aquecida até se tornar pegajosa, então o capilar de vidro é encostado contra a esfera de vidro. Quando a corrente do filamento é desligada, o filamento resfria e retrai, e o capilar aderido a esfera quebra-se com a retração.

A extremidade da pipeta é então lixada para formar um ângulo de 45 graus, usando um lixador de extremidade (*Grinder*, marca Narishige, modelo EG 40 ). Depois de lixada a pipeta é lavada 5 vezes em ácido fluorídrico e 10 vezes em água *Milli Q* (marca *Millipore*) para retirada da poeira de vidro acumulada dentro da mesma. Em seguida é criada, na microforja, uma ponta afiada na extremidade da pipeta pelo toque da ponta do bisel contra a esfera de vidro quente. Para este procedimento a esfera de vidro fica aderente e ligeiramente mais quente que a usada para quebrar a pipeta de injeção. Finalmente, a pipeta é dobrada em um ângulo de 30 graus com o auxílio do calor emitido pela esfera de vidro da microforja.

#### B - Fabricação de pipetas de fixação dos ovócitos

Os capilares de borosilicato utilizados apresentam inicialmente um diâmetro externo (D.E.) de 1mm e um diâmetro interno (D.I.) de 0.78 mm. Para se alcançar o diâmetro ideal para fixar um ovócito, cada capilar é esticado com as mãos pelas extremidades sobre a chama de uma lamparina. O capilar esticado é cortado com o uso de um diamante, no ponto onde o D.E. é de 120mm. As pipetas de fixação são então polidas através de aquecimento usando calor radiante de uma pequena esfera de vidro que foi fusionada no filamento de *platinum iridium* localizado na "microforja". O D.I. da porção polida da pipeta de fixação deve permanecer entre 30-40mm, o que permite que os ovócitos sejam manuseados seguramente, com mínima distorção. A pipeta de fixação finalmente

é dobrada em ângulo de 30 graus através do uso da "microforja", da mesma forma que a angulação da pipeta de microinjeção.

### Preparação dos ovócitos para a injeção

Após a MIV, os ovócitos são expostos a um meio com 1 mg/ml de *hyaluronidase* bovina por 5 minutos. Durante este período os ovócitos são pipetados cuidadosamente até a retirada total das células do *cumulus*. Os ovócitos livres das células do *cumulus* são lavados com meio de bancada (TCM 199 com sais de *Hank's* e 25mM de HEPES, SFB (10% v/v) e antibióticos) e mantidos neste mesmo meio em gotas de 500 $\mu$ l cobertas com óleo mineral. Em seguida, os ovócitos que estiverem apresentando o primeiro corpúsculo polar (CP, Fig. 4) são selecionados em *stereomicroscópio* e separados em outra gota de 500 $\mu$ l de meio de bancada. Somente estes ovócitos que expulsaram o primeiro CP são utilizados para a microinjeção.

Foto: Carlos Frederico

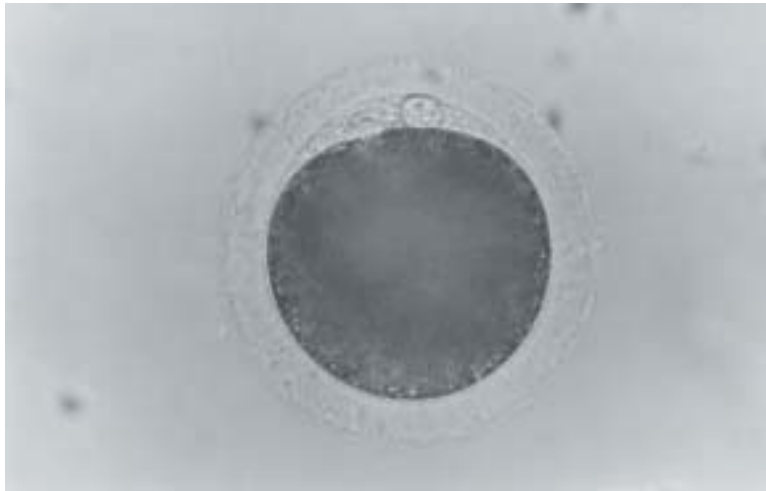


Fig. 4. Ovócito desnudo apresentando o primeiro corpúsculo polar.

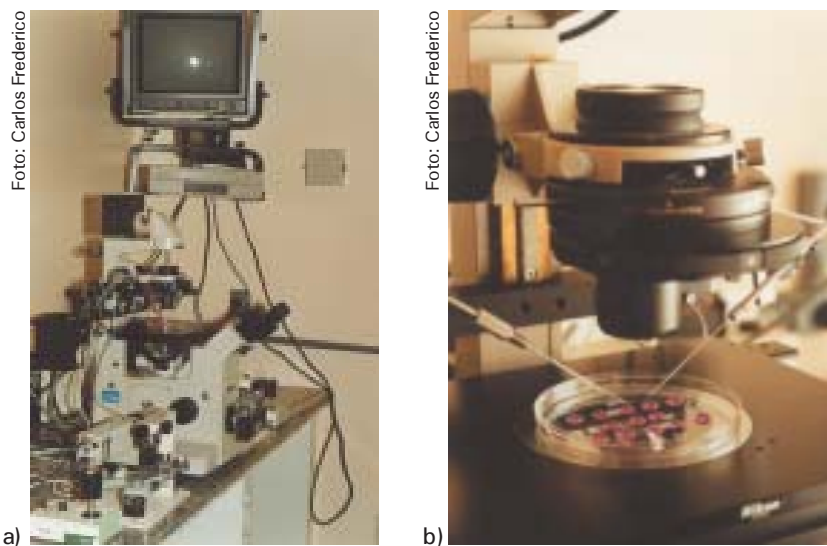
### Preparação dos espermatozóides do epidídimo e ejaculado para a microinjeção

As palhetas de sêmen do ejaculado e epidídimo congelados são descongeladas em água a 35 °C por 30 segundos. Os espermatozóides selecionados através de centrifugação a 700 x g por 20 minutos em gradiente de *Percoll* 45/90%. Os espermatozóides selecionados são capacitados através de incubação com heparina (200  $\mu$ g/ml), durante 15 minutos antes de serem utilizados na ICSI.

### Ajuste geral do micromanipulador

A micromanipulação é conduzida em microscópio invertido. Este aparelho é equipado com dois micromanipuladores de movimentos grosseiros, com controle remoto e dois micromanipuladores hidráulicos de três dimensões, de controle manual e movimentos suaves (Fig. 5 a). Nos micromanipuladores são acopladas as pipetas de micromanipulação, sendo uma para segurar o ovócito e outra para injetar o espermatozóide dentro do citoplasma do ovócito.

Para fixação do ovócito e para microinjeção do espermatozóide é utilizado um sistema hidráulico, onde mangueiras de silicone semi-rígidas estão ligadas a seringas de 3 ml (uma para cada função ou seja, fixação e injeção). Estas seringas têm a função de preencher toda mangueira com líquido inerte de baixa viscosidade. A extremidade final da mangueira é ligada aos instrumentos fixadores de metais, os quais são usados para montar e segurar as pipetas de fixação e injeção no micromanipulador (Fig. 5 b). A sucção para pipeta de fixação e a força de expulsão para microinjeção é controlada pelas seringas de vidro de 3 ml com embolo fixo, sempre tomando-se o cuidado para não formar bolhas no sistema de mangueiras.



**Fig. 5.** a) vista geral do aparelho micromanipulador b) vista aproximada das pipetas e placa de micromanipulação..

O ajuste pré-manipulação do sistema e das pipetas é feito da seguinte forma:

- 1 - As pipetas de fixação e injeção são conectadas aos fixadores de metal (um em cada lado do microscópio)
- 2 - As pontas das pipetas são alinhadas de forma paralela à placa de manipulação. A pipeta de fixação deve ser, primeiro, alinhada na menor magnitude do microscópio (objetiva de 10 x). A pipeta de microinjeção é alinhada baseando-se na pipeta de fixação.
- 3 - Todo o sistema é preenchido com fluído inerte, utilizando-se as seringas de vidro contendo este líquido.
- 4 - Em seguida, as pipetas são mergulhadas em uma gota de 20 $\mu$ l de PVP 10% localizada no centro da placa de manipulação, e pouca quantidade de PVP é aspirada para dentro das pipetas, procurando evitar a formação de bolhas no interior do sistema.

### **Preparação da placa de manipulação de ICSI**

Imediatamente antes da injeção, os ovócitos apresentando o primeiro CP são colocados isoladamente em gotas de 20 $\mu$ l em uma placa de Petri média, sendo 5 gotas por placa. As gotas contendo os ovócitos são dispostas ao redor de uma gota com os espermatozóides do ejaculado e ou epidídimo. A gota com os espermatozóides, localizada no centro da placa de Petri são ser compostas de 1 $\mu$ l da suspensão de sêmen capacitado e 20 $\mu$ l de PVP 10%. O PVP 10% é um meio viscoso que diminui o movimento espermático, facilitando a captura pela pipeta de microinjeção.

### **Procedimentos para microinjeção**

#### **A - Captura do espermatozóide e da espermátide**

Os espermatozóides a serem microinjetados são examinados na gota de PVP 10% em aumento de 200x. É selecionado um espermatozóide com morfologia normal e, que se movimenta lentamente ao longo da base da placa de Petri. Após a seleção de um espermatozóide, a pipeta de injeção é posicionada acima da porção média da cauda do espermatozóide (Fig. 6 a), encostada sobre a cauda, e tracionada lateralmente, imobilizando-o no fundo da placa. Finalmente, o espermatozóide imobilizado é aspirado pela cauda para dentro da pipeta

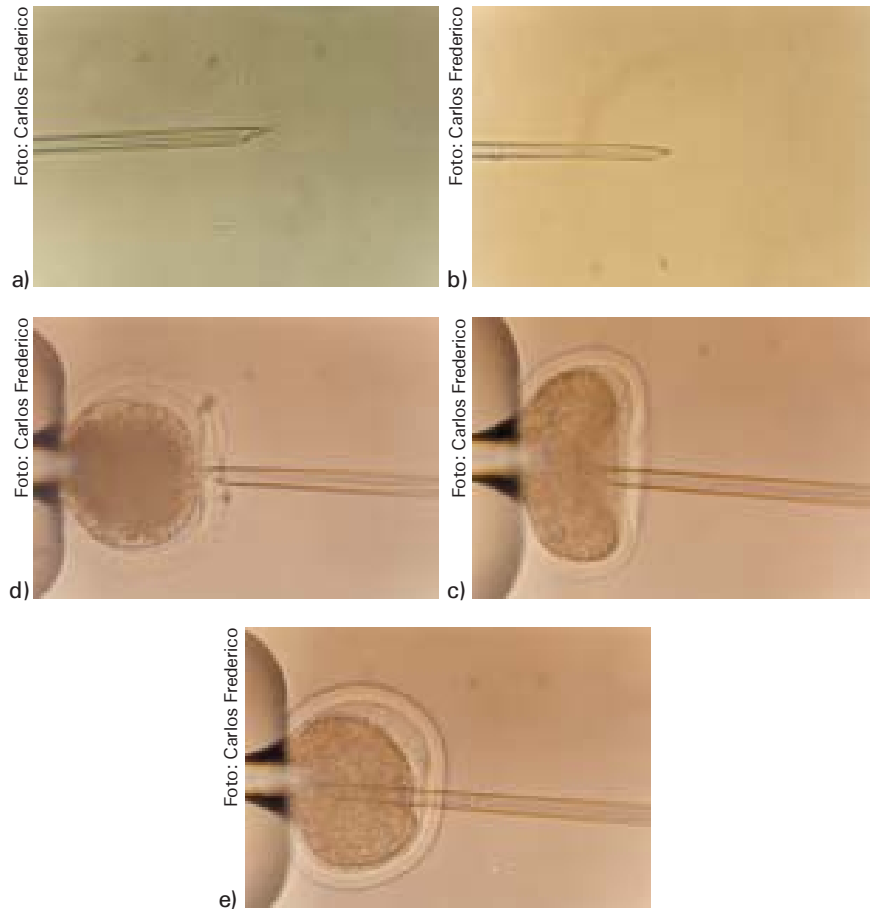
(Fig. 6 b). No momento da captura, o espermatozóide deve ser posicionado próximo da abertura da pipeta de injeção para evitar a entrada de grande quantidade de líquido (PVP) no interior do ovócito.

No caso de espermátides, é necessário romper o citoplasma dessa célula antes da microinjeção. Para isso, deve-se utilizar pipetas com menor diâmetro interno que a célula.

#### **B - Injeção Intracitoplasmática propriamente dita.**

Para a microinjeção, um ovócito é fixado horizontalmente na pipeta usando leve sucção. O corpúsculo polar (C.P.) deve ser orientado na posição de 6 ou 12 horas. A pipeta de injeção contendo um único espermatozóide ou espermátide é transferida da gota de gametas masculinos para a gota que contém o ovócito. Em seguida, a pipeta de injeção é localizada com a ponta direcionada para a posição de 3 horas em relação ao CP (Fig. 6 c) e colocada no mesmo foco que a membrana pelúcida. Na seqüência, a pipeta de injeção é empurrada firmemente contra a zona pelúcida (ZP) (Fig. 6 d) até perfurá-la e estar situada bem dentro do ovócito. Para garantir que a membrana plasmática se rompa e que o espermatozóide seja depositado no local correto, o citoplasma do ovócito é aspirado para dentro da pipeta (Fig. 6 e) até haver um súbito aumento na velocidade do movimento do citoplasma no interior da pipeta, que indica que a membrana se rompeu. O citoplasma aspirado deve então ser empurrado suavemente para dentro do ovócito e com ele o espermatozóide ou espermátide. A pipeta de injeção é então retirada do ovócito e o local da perfuração da membrana plasmática assume lentamente (1-5 min) sua configuração original.





**Fig. 6.** Procedimento de injeção intracitoplasmática de espermatozoides:  
a): imobilização do espermatozóide; b) aspiração do espermatozóide pela cauda;  
c) posicionamento em mesmo foco do ovócito e do espermatozóide; d) inserção da pipeta de injeção no interior do ovócito; e) aspiração do citoplasma do ovócito para garantir a ruptura da membrana plasmática, para posterior deposição do espermatozóide no ooplasma.

### Ativação dos ovócitos microinjetados

Os ovócitos, após meia hora da microinjeção são ativados pela exposição ao cálcio ionóforo A23187 por um período de 5 minutos. Após este período, os ovócitos são incubados por 3 minutos em PBS com BSA fração V (6mg/ml),

para bloquear o processo de ativação. Em seguida, os ovócitos são lavados em meio SOF e colocados para cultivo sem co-cultura de células por 7 dias.

## Fatores que Influenciam a Técnica de ICSI

A injeção intracitoplasmática de espermatozóide é uma técnica que transgride todas as barreiras naturais para a penetração do espermatozóide e remove toda a seletividade biológica do processo de fecundação, tais como aderência do espermatozóide a zona pelúcida e fusão do espermatozóide com a membrana plasmática (GORDON & LAUFER, 1988). No entanto, apresenta como principal vantagem a possibilidade de microinjeção de qualquer célula espermática que apresente núcleo íntegro ou somente cabeça do espermatozóide, espermatozóide imóvel ou morto (IRITANI, 1991) e mais recente a microinjeção de espermatozóide liofilizado (KESKINTEPE et al., 2001).

A ICSI, apesar de ser uma técnica com inúmeras possibilidades, apresenta muitos detalhes para sua realização com sucesso. Qualquer falha nas diferentes etapas do procedimento pode culminar em insucesso da técnica. Desta forma, foi descrito abaixo uma série de pontos que podem influenciar a ICSI:

Na injeção intracitoplasmática, injúrias mecânicas ao citoesqueleto e organelas do citoplasma podem ser causadas pela agulha de microinjeção e contaminantes biológicos que poderiam ser introduzidos. Estas condições desfavoráveis podem causar uma perda embrionária após a transferência do embrião microfertilizado (IRITANI, 1991).

As pipetas de microinjeção por serem microscópicas parecem não serem fatores limitantes, no entanto, segundo TOCHARUS et al. (1996), um maior desenvolvimento embrionário foi alcançado com a utilização de pipetas de diâmetros menores. Estes resultados indicaram que uma força mecânica adicional e um aumento de volume de solução microinjetada, ocorrem quando uma pipeta de grande diâmetro é utilizada, podendo causar danos aos ovócitos e atraso no desenvolvimento embrionário. A cabeça do espermatozóide bovino mede aproximadamente  $5\mu\text{m}$ , portanto a pipeta ideal para microinjeção deve apresentar  $6\text{-}7\mu\text{m}$  de diâmetro interno e  $8\text{-}9\mu\text{m}$  de diâmetro externo (GOTO et al., 1996).

A maturação citoplasmática também é importante para o sucesso da injeção intracitoplasmática de espermatozóide. Embora a ICSI pareça “dispensar” as interações da membrana plasmática dos gametas, somente os ovócitos maturados tem a capacidade de descondensar a cabeça espermática. Isto acontece porque o citoplasma do ovócito maturado apresenta resposta com um sinal para programar o desenvolvimento embrionário e transformar a cromatina espermática em pró-núcleo masculino (PERRAULT, 1990).

Acreditava-se que o processo de ICSI seja difícil em bovinos, devido a forma distinta do núcleo espermático (achatado e grande em tamanho) e a invisibilidade do *ooplasma* sob microscopia óptica. Além disso, tem sido sugerido que o desenvolvimento incompleto do pró-núcleo masculino dentro do *ooplasma* depende do número de pontes de dissulfeto (S-S) na cromatina nuclear de espermatozoides bovinos. De fato, este número de pontes de dissulfeto da cromatina em touros, é relativamente maior quando comparado com o núcleo espermático de outras espécies mamíferas (SELIGMAN et al., 1991) e provavelmente leva um tempo maior para descondensar e desenvolver em pró-núcleo (QIAN et al., 1996). Assim, a descondensação e a formação pró-nuclear após ICSI pode depender da permeabilização da membrana espermática. A remoção artificial do acrossoma e cauda através de meios físicos tais como sonicação (GOTO, 1993), imobilização do espermatozóide por congelamento e descongelamento (CATT & RHODES, 1995; PERRAULT et. al., 1988), ou colisão da pipeta de injeção contra a cauda espermática (KESKINTEPE & BRACKETT, 1999) antes da ICSI, melhoram os resultados obtidos. O espermatozóide de hamster, coelho e peixe descondensam após a injeção no interior de ovócitos heterólogos e homólogos, sem qualquer pré-tratamento. Enquanto que os espermatozoides dos bovinos (CATT & RHODES, 1995; KEEFER, 1989; RALL & FAHY, 1985), caprinos (KESKINTEPE & BRACKETT, 1999, KESKINTEPE et. al., 1997), suínos (CATT & RHODES, 1995) e eqüinos (BRINGING, 1998) requerem um tratamento específico (capacitação) antes da injeção para completar a liberação do material genético. Na tentativa de induzir a descondensação da cabeça espermática, tratamentos com vários detergentes ou redução das pontes de dissulfeto, como o pré-tratamento dos espermatozoides com DDT (*dithiothetol*) (PERRAULT et. al., 1988) têm sido utilizados.

Segundo PAYNE (1995), duas ações técnicas são cruciais para o sucesso da ICSI: imobilização espermática e ruptura da membrana plasmática do ovócito.

A imobilização do espermatozóide pela pipeta de injeção tem importantes conseqüências para fecundação, uma vez que o contato da pipeta com a cauda espermática promove uma ruptura da membrana plasmática (DOZORTSEV et al., 1994). A lesão na cauda do espermatozóide permite a liberação de fatores citoplasmáticos, ainda não identificados, no interior do ovócito, os quais induzem a descondensação da cabeça espermática (FLAHERTY et al., 1995; PAYNE, 1995). Também há evidências de que os fatores citosólicos espermáticos são responsáveis pela ativação do ovócito após a ICSI (DOZORTSEV et al., 1995).

A membrana plasmática do ovócito deve ser rompida durante o procedimento, caso contrário, o espermatozóide não será depositado no interior do ovócito, mas somente deixado na invaginação do *oolema*. Para garantir que o espermatozóide seja depositado no interior do ovócito, a pipeta de microinjeção deve ser inserida até a metade do ovócito, e em seguida, uma pressão aspirativa é exercida, fazendo com que o espermatozóide juntamente com o *oolema* movam-se para dentro da pipeta. A pressão é continuada até que o *oolema* se rompa. Em seguida, o citoplasma e o espermatozóide são retornados para o interior do ovócito e a pipeta de injeção retirada. Segundo CATT (1996) nos ovinos, suínos e bovinos, o *oolema* tem se apresentado muito elástico, freqüentemente requerendo uma aspiração de mais de 100 $\mu$ m para dentro da pipeta de injeção para garantir a ruptura (PAYNE, 1995).

A variação entre espécies é uns dos principais pontos a serem considerados para aplicação da ICSI nos animais domésticos. Uma das principais diferenças verificadas está na habilidade dos ovócitos se ativarem após a ICSI. Nos humanos, coelhos e camundongos somente o ato da injeção e deposição do espermatozóide no citoplasma já é suficiente para induzir a ativação dos ovócitos (GRONDAHL et. al., 1997), porém, nos bovinos, menos de 20% dos ovócitos se ativam sem processos artificiais (CUMMINS & JEQUIER, 1994; GOTO et. al., 1990; MAHI & YANAGIMACHI, 1975).

A fecundação do ovócito bovino com ICSI requer uma apropriada ativação do ovócito (CAMPBELL, et. al., 1993; KEEFER et. al., 1990; KESKINTEPE & BRACKETT, 1999) para retomada e finalização da meiose. A ativação pode ser induzida por uma variedade de estímulos, incluindo exposição ao cálcio ionóforo (WARE et. al., 1989), etanol

(MINAMHASHI et. al., 1993, POWELL & BARNES, 1992), corrente elétrica (CAMPBELL et. al., 1993, WARE et. al., 1989), *cycloheximide*, ou 6-*dimethylaminopurine* (DMAP) (POWELL & BARNES, 1992).

Embora o mecanismo preciso de ativação do ovócito na ICSI não tenha sido demonstrado, um aumento no cálcio intracelular é provavelmente envolvido porque (i) tem uma função obrigatória na fecundação normal (KLINE & KLINE, 1992), (ii) as oscilações de cálcio são observadas nos ovócitos após a inseminação humana (TAYLOR et al., 1993), (iii) aumento de cálcio é detectado após a ICSI (TESARIK et al., 1994) e (iv) ovócitos que tem falhado na fecundação por ICSI têm apresentado grânulos corticais intactos, sugerindo inadequada elevação de cálcio (SOUSA e TESARIK, 1994).

A principal falha de fecundação após a ICSI é a inadequada ativação dos ovócitos, possivelmente combinada com deficiente maturação citoplasmática *in vitro*, que pode resultar em baixa descondensação da cabeça espermática e decréscimo no desenvolvimento embrionário. Desta forma, um melhoramento da técnica de maturação e ativação do ovócito *in vitro* é necessário para aumentar as taxas de fecundação e formação de blastocisto após a ICSI (GÓMEZ et. al., 1998).

## Aplicações da Microinjeção de Células Espermáticas

Há várias razões para o estudo da injeção direta de espermatozóides dentro de ovócitos de espécies animais. Estes estudos possibilitam a pesquisa de aspectos fundamentais da fecundação e desenvolvimento embrionário. Historicamente o uso de modelos animais para o entendimento de mecanismos humanos tem sido provado ser muito útil, embora cuidados devam ser tomados sempre que haja extrapolação de uma espécie para outra. Também pode haver aplicação da ICSI nos próprios animais onde, por uma razão ou outra, as técnicas de fecundação *in vivo* ou *in vitro* não são possíveis (CATT & RHODES, 1995).

A técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóide tem assumido atualmente um impacto direto na reprodução dos bovinos. Um dos exemplos é a propagação direta. Nesse caso, um touro premiado possuidor de excelentes características produtivas, mas com baixa qualidade espermática como motilidade e pouca produção de espermatozóides entre outras, decorrente de alterações

fisiológicas adquiridas, não pode ser usado para inseminação artificial e nem para a fecundação *in vitro*. Neste caso, a ICSI pode ser praticada com sucesso para gerar embriões (CATT & RHODES, 1995).

Segundo SOULÉ (1986), o crescimento populacional humano exponencial e desordenado está associado com o declínio no número de outras espécies selvagens que não são capazes de ocupar os mesmos locais. Além deste problema, os países que estão em desenvolvimento, inevitavelmente, serão obrigados a aumentar a produção de alimentos, ocupando maiores áreas, no entanto sem contar mais com o possível auxílio desta biodiversidade local (plantas e animais). Nestes casos, a ICSI, junto com os criobancos de germoplasma masculino é importante ferramenta para auxiliar na preservação animal *ex-situ*. Muitas vezes, estes animais por serem mantidos em condições distantes do seu ambiente original (Parques e Zoológicos), sem alimentação nativa, paralisam sua reprodução. Desta forma, as biotécnicas são necessárias para a multiplicação destas espécies animais.

A ICSI também tem sido aplicada em benefício de outras técnicas. Por exemplo, ovócitos submetidos ao processo de criopreservação (MATSON et. al., 1997) ou resfriamento (AZAMBUJA et. al., 1998) sofrem um endurecimento da membrana pelúcida, dificultando a penetração natural do espermatozóide na FIV. Nestes casos, a ICSI pode ser requerida e considerada uma biotecnica estratégica para alcançar a fecundação e desenvolvimento embrionário, uma vez que insere mecanicamente um espermatozóide no citoplasma do ovócito, ultrapassando assim a barreira da membrana pelúcida endurecida (MATSON et. al., 1997).

Outra aplicação importante da ICSI é na utilização de espermatozoides sexados, uma vez que a citometria de fluxo, método mais substancial utilizado na separação do espermatozóide masculino do feminino, não fornece, até o momento, quantidade suficiente de espermatozoides viáveis para o uso na IA ou FIV (CATT & RHODES, 1995).

A ICSI também tem sido utilizada para produção de animais transgênicos. PERRY et. al. (1999) descreveram a produção de animais transgênicos utilizando o espermatozóide como veículo de DNA exógeno. Através de eletroporação (formação de poros na membrana), foi possível inserir genes desejáveis na cabeça do espermatozóide, facilitando a introdução destes genes durante a fecundação.

A mais recente aplicação da ICSI em bovinos foi descrita por KESKINTEPE *et al.* (2001), através da microinjeção de espermatozóide liofilizado e produção de embriões viáveis, garantindo a eficácia de mais um método de armazenamento de gametas masculinos.

### **A Experiência da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia com Técnica de Microinjeção de Células Espermáticas**

A técnica de ICSI tem sido estudada no LRA desde 1997. Neste período inicial a pesquisadora Hévila Salles, desenvolvendo sua tese de doutorado, conquistou importantes informações, as quais foram utilizadas com grande valia em nosso trabalho.

Atualmente, a ICSI tem sido uma ferramenta importante para testar o potencial de fecundação de diferentes tipos celulares, tais como espermatozoides do ejaculado, do epidídimo e espermátides.

Assim, o enfoque principal da técnica injeção intracitoplasmática de espermatozóide tem sido a utilização do germoplasma masculino, na busca por alternativas para a multiplicação de animais em risco de extinção.

Na seqüência serão relatados alguns estudos realizados neste presente trabalho:

**Estudo I:** Verificação do potencial das espermátides versus espermatozoides do ejaculado

O objetivo deste experimento foi à utilização de espermátides em alongamento na técnica de injeção intracitoplasmática e avaliação da capacidade destes gametas promoverem a fertilização e o desenvolvimento de ovócitos bovinos maturados *in vitro*. Os resultados obtidos com espermátides foram comparados àqueles obtidos com espermatozoides do ejaculado. Neste estudo, as espermátides foram isoladas 48 horas antes da microinjeção e avaliadas quanto a integridade da cromatina, para que somente o *pool* de células espermáticas apresentando 100% de cromatina íntegra fossem utilizados na ICSI.

De acordo com nosso trabalho, ao comparar a microinjeção de espermátides com espermatozóides do ejaculado foi possível verificar uma taxa clivagem em 50,00 % dos ovócitos microinjetados com espermátides, enquanto que os microinjetados com espermatozóides do ejaculado apresentaram 48,65 % de clivagem (Tabela 1). Desta forma, não houve diferença significativa entre as duas células neste parâmetro. Estes resultados foram superiores ao obtidos por GOTO et. al. (1996), os quais relataram 35,7 % e 32 % de clivagem para microinjeção de espermátides e espermatozóides bovinos, respectivamente.

**Tabela 1.** Taxas de clivagem em ovócitos bovinos submetidos a várias tentativas de injeção intracitoplasmática com espermatozóides do ejaculado e espermátides.

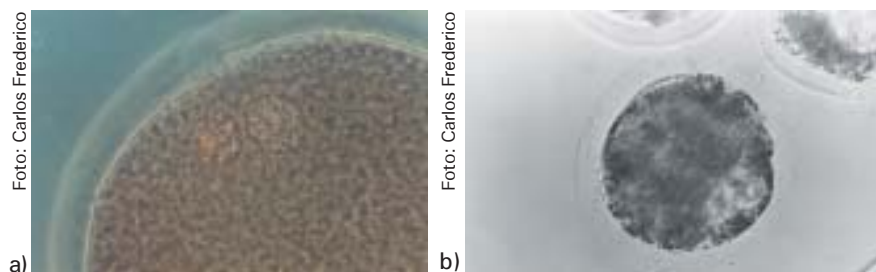
Eventos	Total de ovócitos manipulados	Clivados(%)	Não clivados(%)
ICSI ejaculado	74	48,65 <sup>b</sup>	51,35
*ELSI	72	50,00 <sup>b</sup>	50,00
**Sham injection	55	21,82 <sup>c</sup>	78,18
FIV convencional	129	75,19 <sup>a</sup>	24,81

<sup>a,b</sup>Diferentes letras na mesma coluna denotam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ).

\* ELSI = sigla denominando a injeção intracitoplasmática de espermátide alongada

\*\* Sham injection = é uma falsa microinjeção realizada sem célula. Serve para testar a ocorrência de desenvolvimento partenogenético

Os dados foram analisados pelo teste de Qui-quadrado, utilizando o procedimento CATMOD do SAS (SAS, 1995).



**Fig. 7.** a) pró-núcleos formados por injeção intracitoplasmática de espermátides; b) embrião produzido por injeção intracitoplasmática de espermatozóide.



Neste estudo não houve desenvolvimento embrionário com ELSI até a fase de blastocisto, porém 2,7 % dos ovócitos microinjetados com espermátides apresentaram desenvolvimento embrionário até 16 células (Tabela 2). O controle partenogenético (*sham injection*) atingiu desenvolvimento embrionário somente até 8 células (1,82 %). Este resultado indica que o desenvolvimento dos ovócitos microinjetados com espermátides até 16 células aconteceu com participação do material genético masculino. Isto confirma as proposições de OGURA & YANAGIMACHI (1993), GOTO et. al. (1996), KIM & SHIM (2000) e HOSOI et. al. (2000) de que as espermátides são células com competência para participar da singamia e gerar desenvolvimento embrionário.

De modo geral a ICSI com espermatozóide do ejaculado foi significativamente superior que a ELSI, onde  $P=0,0198$  pelo teste de Cochran-Mantel-Haenszel do SAS (SAS, 1995)

**Tabela 2.** Taxas observadas do desenvolvimento embrionário por tratamento

Eventos	Total de ovócitos	Desenvolvimento Embrionário				Blastocisto em D7 (%)
		2 células (%)	4 células (%)	8 células (%)	16 células (%)	
ELSI	71	9,46	18,92	17,57	2,70	0,00 <sup>c</sup>
ICSI ejaculado	74	11,27	9,86	9,86	12,68	5,63 <sup>b</sup>
<i>Sham injection</i>	55	1,82	18,18	1,82	0,00	0,00 <sup>c</sup>
FIV	129	—	—	—	—	34,12 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> Diferentes letras na mesma coluna denotam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ )

\* ELSI = sigla denominando a injeção intracitoplasmática de espermátide alongada

\*\* Sham injection = é uma falsa microinjeção realizada sem célula. Serve para testar a ocorrência de desenvolvimento partenogenético

Os dados foram analisados pelo teste de Qui-quadrado, utilizando o procedimento CATMOD do SAS (SAS, 1995).

Houve diferenças entre os tratamentos no que se refere ao desenvolvimento embrionário ( $P=0,002$ , teste de Cochran-Mantel-Haenszel do SAS). A ELSI produziu mais embriões com 4 e 8 células que os outros tratamentos. No entanto, somente com a ICSI de espermatozóides do ejaculado observou-se a produção de blastocistos.

Diferente do observado com a ELSI, na injeção de espermatozóides a taxa de blastocistos foi de 5,63 %, sugerindo que o gameta maduro tem maior potencial

fecundante que o gameta imaturo (espermátides) nos bovinos. Isto contraria GOTO et. al. (1996) que afirmaram que espermatozóides do ejaculado, do epidídimo e espermátides apresentam o mesmo potencial para produção de blastocisto. No entanto, neste estudo GOTO et. al. utilizaram espermátides à fresco, diferentemente do nosso estudo, onde foram utilizadas espermátides resfriadas por 48 horas. Também, segundo KIMURA & YANAGIMACHI (1995) e SOFIKITIS et. al. (1995) utilizando camundongos e coelhos, respectivamente como modelo animal, a microinjeção de espermátides redondas resultou em desenvolvimento embrionário normal, entretanto, estas taxas foram muito baixas. De acordo com KIMURA & YANAGIMAGHI (1995), FISHEL et. al. (1996) e ANTINORI et. al. (1997), as baixas taxas obtidas com a utilização de espermátides podem ser devido a variações na função do centrossoma, ativação do ovócito (ausência de fatores para ativação), impressão do genoma, proteínas nucleares de maturação e assincronia do ciclo celular entre espermátides e ovócito. Ainda, segundo ANGELOPOULOS et. al. (1997) dificuldades técnicas, como incorreta identificação das espermátides, principalmente das redondas, podem também ser responsáveis pelas baixas taxas de blastocistos observadas.

Neste experimento foi possível identificar a ocorrência de fecundação e desenvolvimento embrionário após a microinjeção de espermátides em alongamento resfriadas. Apesar da não obtenção de blastocistos, houve um desenvolvimento embrionário regular e considerável. Talvez com a utilização de um método menos agressivo ao ovócito, como o *piezo driven micromanipulator*, utilizado na maioria dos centros de pesquisa com ICSI, bem como a utilização de um melhor método de ativação dos ovócitos bovinos, em breve será possível produzir blastocistos de espermátides resfriadas de forma rotineira.

**Estudo II.** Comparação do potencial de fecundação de espermatozóides do epidídimo versus espermatozóides do ejaculado.

O objetivo deste experimento foi à utilização de espermatozóides do epidídimo (imaturados) e do ejaculado (maduro) bovino na técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) e avaliação da capacidade destes gametas promoverem a fertilização e o desenvolvimento de ovócitos bovinos maturados *in vitro*.

Neste estudo foi obtido 62,86%, 62,50%, 17,50%, 76,77% de clivagem respectivamente para ICSI de espermatozóides de epidídimo, ICSI de espermatozóides do ejaculado, *Sham injection* e FIV convencional (Tabela 3).

Estes resultados foram superiores aos de GOTO et. al. (1996), que obtiveram 33,3%, 32% e 22% de clivagem de ICSI de espermatozóides do epidídimo, ejaculado e sem células. Considerando somente a taxa de clivagem obtida por ICSI de espermatozóides do ejaculado, os resultados acima relatados superam àqueles alcançados por GOTO et. al. (1990), CHEN & SEIDEL (1997), KESKINTEPE & BRACKETT (1999), SUTTNER et. al. (2000). Ainda, no presente estudo foram obtidos resultados de clivagem semelhantes aos descritos por CHUNG et. al. (1999) que utilizaram ionomicina e 6-DMAP para ativar os ovócitos bovinos. Porém, nossos resultados foram inferiores aos resultados de HORIUCHI et. al. (2000), os quais utilizaram um *piezo driven* para a micromanipulação e etanol 7% para ativar os ovócitos. Neste estudo, a taxa de clivagem obtida pela injeção sem célula (*sham injection*) foi de 17,50 %. Este resultado foi semelhante ao obtido por GOTO et. al. (1996), porém, inferior ao obtido por CHEN & SEIDEL (1997) e superior ao de KESKINTEPE & BRACKETT (1999). Contudo, nos experimentos descritos acima, nenhum dos ovócitos utilizados na *sham injection* alcançaram a fase de mórula, concordando com os nossos resultados.

Quanto a produção de blastocistos, as taxas foram de 11,43%, 7,50% e 48,48%, respectivamente, para ICSI de espermatozóides do ejaculado, do epidídimo e FIV convencional (Tabela 3). Estes resultados foram superiores aos obtidos por GOTO et. al. (1996), utilizando estes dois tipos celulares. Em relação a ICSI de espermatozóides do ejaculado, nossos dados foram semelhantes aos relatados por CHEN E SEIDEL (1997) e KESKINTEPE & BRACKETT (1999), superiores aos dados de SUTTNER et. al. (2000), porém inferiores aos dados de HORIUCHI et. al. (2000).

**Tabela 3:** Comparação entre ICSI de espermatozóides do epidídimo versus ejaculado.

Eventos	N ° de ovócitos manipulados	Clivagem(%)	Blastocisto em D7(%)
ICSI ejaculado	35	62,86 <sup>b</sup>	11,43 <sup>a</sup>
ICSI epidídimo	40	62,50 <sup>b</sup>	7,50 <sup>a</sup>
Sham injection	40	17,50 <sup>c</sup>	0,00 <sup>c</sup>
FIV	99	76,77 <sup>a</sup>	48,48 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup> Diferentes letras na mesma coluna denotam diferenças estatísticas (p < 0, 05)

Os dados foram analisados pelo teste de Qui-quadrado, utilizando o procedimento CATMOD do SAS (SAS, 1995).

No entanto, a taxa de blastocistos provenientes da fecundação *in vitro* convencional foi bem superior as obtidas com a ICSI (Tabela 3).

Apesar das baixas taxas de blastocistos alcançadas, este experimento mostrou ser possível a produção de embriões bovinos, através de microinjeção de espermatozoides criopreservados do epidídimo. Um dos fatores que pode ter contribuído para essa menor taxa de blastocisto pode ser o método utilizado. Visto que KIMURA & YANAGIMACHI (1995) relatam que uma das causas das baixas taxas de produção de blastocistos ocorrer na ICSI convencional, é devido a dificuldade de ultrapassar o oolema. Assim sendo, o espermatozóide pode ser depositado no espaço perivitelino.

## Considerações Finais e Perspectivas Futuras

A ICSI é uma técnica de recente desenvolvimento na área animal, necessitando de estudos para seu aperfeiçoamento, principalmente na espécie bovina.

No laboratório de reprodução animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, a técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides já foi estabelecida, porém ainda necessita de aprimoramento.

Desta forma, um melhor conhecimento da técnica de ICSI e dos processos de fecundação envolvidos, pode garantir uma máxima utilização dos recursos genéticos animais, oferecendo mais opções para a recuperação, preservação e multiplicação de material genético raro e em perigo de extinção.

Ainda, a ICSI apresenta importantes perspectivas futuras de seu uso no auxílio de outras biotecnologias. Como exemplo, é possível citar umas das linhas de pesquisas atuais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, onde a abordagem é conservar espermatozoides por liofilização ("espermatozoides em pó" a partir da desidratação celular por baixas temperaturas e vácuo). Neste caso, os espermatozoides perdem seu movimento e por conseguinte, a capacidade de penetrar no óvulo, no entanto, não perdem sua viabilidade. Sendo assim, com a utilização da ICSI, o espermatozóide poderá ser depositado no interior do ovócito e participar normalmente do processo de fecundação.

Por estas e outras aplicações, a ICSI, tem se constituído em uma importante biotécnica, apresentando um amplo campo para estudos futuros.

## Referências Bibliográficas

ANGELOPOULOS, T.; KREY, L.; MC CULLOUGH, A.; ADLER, A; GRIFO, J. A simple and objective approach to identifying human round spermatids. **Human Reproduction Update**, v.12, n.10, p.2208-2216, 1997.

ANTINORI, S.; VERSACI, C.; DANI, G. et al. Fertilization with human testicular spermatids: four successful pregnancies. **Human Reproduction Update**, v. 12, p. 286 – 291, 1997.

ASLAM, I.; ROBINS, A.; DOWELL, A.; FISHEL, S. isolation, purification and assessment of viability of spermatogenic cells from testicular biopsies of azzospermic men. **Human Reproduction Update** v. 13, n. 3, p. 639-645, 1998.

AZAMBUJA, R.M., KRAEMER, D.C., WESTHUSIN, M.E. Effect of low temperatures on in-vitro matured bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 49, p. 1155-64, 1998.

BARTON, S.C., FERGUNSON-SMITH, A.C., FUNDELE, R., SURANI, A.Z. Influence of paternally imprinted genes on development. **Development**, v. 113, p. 679-688, 1991.

BERNABEU, R., CREMADES, N., TAKAHASHI, K., SOUSA, M. Successful pregnancy after spermatid injection. **Human Reproduction Update**, v. 13, p. 1898-1900, 1998.

BRINGING HIGH-TECH to HORSE BREEDING. **Science**, v. 280, p. 207, 1998.

CAMPBELL, K.H.S., RITCHIE, W.A., WILMUT, I. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development. **Biol. Reprod.**, v. 49, p. 933-42, 1993.

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

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

CHEN, S.H., SEIDEL, Jr. Effects of oocyte activation and treatment of spermatozoa on embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in cattle. **Therio.**, p.1265-73, 1997.

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

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

DOZORTSEV, D., De SUTTER, P., DHONT, M. Damage to the sperm plasma membrane by touching the sperm tail with a needle prior to intracytoplasmic injection. **Hum. Reprod.**, v.9, p.40, 1994 (abstr).

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

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

FISHEL, S., ASLAM, I., TESARIK, J. Spermatid conception: a stage too early, or a time too soon ? **Hum. Reprod.**, v.11, p.1371-75, 1996.

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

GÓMEZ, M.C., CATT, J.W., EVANS, G., MAXWELL, M.C. Sheep oocyte

activation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Reprod. Fertil. Dev.**, v.10, p.197-205, 1998.

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

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

GOTO, K. Bovine microfertilization and embryo transfer. **Mol Reprod. Dev.**, v.36, p.288-290, 1996.

GRONDAHAL, C., HANSEN, T.H., HOSSAINI, A., HEINZEL, I., GREVE, T., HYTTEL, P. Intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured equine oocytes. **Biol. Reprod.**, p.1495-1501, 1997.

HAMANO, K-I., LI, X., QIAN, X-Q., FUNAUCHI, K., FURUDATE, M., MINATO, Y. Gender preseletion in catle with intracytoplasmically injected, flow cytometrically sorted heads. **Biol. Reprod.**, v.60, p.1194-97, 1999.

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

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

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

KAMEYAMA, K., HAMANO, K., SUGAWARA, S., MASAKI, J. **J. Mamm ova res.** v.2, p.25, 1985.

KEEFER, C.L., YOUNIS, A. I., BRACKETT, B.G. Cleavage development of bovine oocytes fertilized by sperm injection. **Mol. Reprod. Dev.**, v.25, p.281-5, 1990.

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

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

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

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

KIM, N.H., SHIM, H. Intracytoplasmic sperm injection in pigs. **Embryo Transfer Newsletter**. p.10-13, 2000.

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

KLINE, D., KLINE, J.T. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. **Dev. Biol.**, v.149, p.80-9, 1992.

LI, X., HAMANO, K-I., QIAN, W-Q., FUNAUCHI, K., FURUDATE, M. MINATO, Y. Oocyte activation and parthenogenetic development of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. **Zygote**, v.7, p.233-37, 1999.

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

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



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

MATSON, P.L., GRAEFLING J., JUNK, J.M., YOVICH, J.L., EDIRISINGHE, W.R. Cryopreservation of oocytes and embryos: use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an in-vitro fertilization programme. **Hum Reprod.**, v.12, p.1550-53, 1997.

MICROCAL ORIGIN, SCIENTIFIC AND TECHNICAL GRAPHICS IN WINDOWS  
Version 4.10, 1996

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

OGURA, A., MATSUDA, J., YANAGIMACHI, R. Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 91, p.7460-2, 1994.

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

PALERMO, G., DEVROEY, P., VAN STEIRTEGHEM, A.C. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. **Lancet**, v. 340, p. 17-18, 1992.

PALERMO, G., JORIS, H., DERDE, M.P., CAMUS, M., DEVROEY, P., VAN STEIRTEGHEM, A. Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. **Fertil. Steril.**, v. 59, p. 826-35, 1993.

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

PERREAULT, S.D., BARBEE, R.R., ELSTEIN, K.H., ZUCKER, R.M., KEEFER, C.L. Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo by sperm microinjection and in vitro by flow cytometry. **Biol. Reprod.**, v.39, p.157-167, 1988.

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

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

POWELL, J.W., BARNES, F.L. The kinetics of oocyte activation and polar body formation in bovine embryo clones. **Mol. Reprod. Dev.**, v.32, p.252-57, 1992.

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

RALL, W.F., FAHY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse oocytes at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. **Nature**, v.313, p.573-75, 1985.

RHO, G., KAWARSKY, S., JOHNSON, W.H., KOCHHAR, K. Sperm and oocyte treatments to improve the formation of male and female pronuclei and subsequent development following intracytoplasmic sperm injection into bovine oocytes. **Biol. Reprod.**, v.59, p.918-24, 1998.

SAS INSTITUTE INC. Sas user's guide: statistics. Versão 6.0, Cary, NC., 1995. 956p.

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

SILBER, S.J., VAN STEIRTEGHEM, A.C., LIU, J., NAGY, Z., TOURNAYE, H., DEVROEY, P. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm

injection:with spermatozoa obtained from testicle biopsy. **Hum. Reprod.**,v.10, 148-52, 1995.

SOFIKITIS, N. V.,MIYAGAWA, I., AGAPITOS, E., PASIYANOS, P., TODA, T., HELLSTROM, W.J.G., KAWAMURA, H. Reproductive capacity of the nucleus of the male gamete after completion of meiosis. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v.11, p.335-41, 1994.

SOULE, M.E. What do we really know about extinction ? **Genetics and Conservation.**, p.111-124, 1986.

SOUSA, M., TESARIK, J. Ultrastructural analysis of fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection. **Hum. Reprod.**, v.6, p.2374-80, 1994.

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

SUZUKI, K., YANAGIDA, K., YANAGIMACHI, R. Comparison of the media for isolation and storage of round spermatid nuclei before intracytoplasmic injection. **J Ass. Reprod. and Gen.**, v.15, n 3, p.154-59, 1998.

TAYLOR, C.T., LAWRENCE, Y.M., KINGSLAND, C.R., BILJAN, M.M., CUTHBERTSON, K.S.R. Oscillations in intracellular free calcium induced by spermatozoa in human oocytes at fertilization. **Hum. Reprod.**, v.8. p.2174-79, 1993.

TESARIK, J. MENDOZA, C. TESTART, J. Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. **N. Engl. J. Med.** v.333, p.525, 1995.

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

THADANI, V.M. A study of hetero-specific sperm –egg interactions in the rat, mouse, and deer mouse using in vitro fertilization and sperm injection. **J.Exp. Zool.**,v.212, p.435-53, 1980.

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

TOURNAYE, H., DEVROEY, P., LIU, J., NAGY, Z., LISSENS, W., VAN STEIRTEGHEM, A. Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. **Fertil. Steril.** v.61, 1045-51, 1994.

TROUNSON, A, GUNNL, L., LACHAM-KAPLAN, O. LEWIS, I., MACKINNON, A, PEURA, T., SHAW, J. Manipulation of development: opportunités for animal breeding. **Gametes: develop. and func.**, p. 485 –98. 1998.

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

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

VAN STEIRTEGHEM, A.C., NAGY, Z., JORIS, H., LIU, J., STAESSEN, C., SMITZ, J., WINSANTO, A., DEVROEY, P. High fertilization and enplantation rates after intracytoplasmic sperm injection. **Hum. Reprod.**, v. 8, p. 1061-6, 1993 b.

VANDERZWALMEN, P., LEJEUNE, B., NIJS, M. Fertilization of na oocyte microinseminated with a spermatid in a in vitro fertilization programme. **Hum. Reprod.** v.10, p.502-03, 1995.

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

WESTHUSIN, M.E., ANDERSON, J.G., HARMS, P.G., KRAEMER, D.C.  
Microinjection of spermatozoa in bovine eggs. **Therio.**, v.21, p.274, 1984.

YAMANAKA, K., SOFIKITIS, N. and MIYAGAWA, I. Ooplasmic round  
spermatid nuclear injection procedures as an experimental treatment for  
nonobstructive azoospermia. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v.14, p.55-62, 1997.