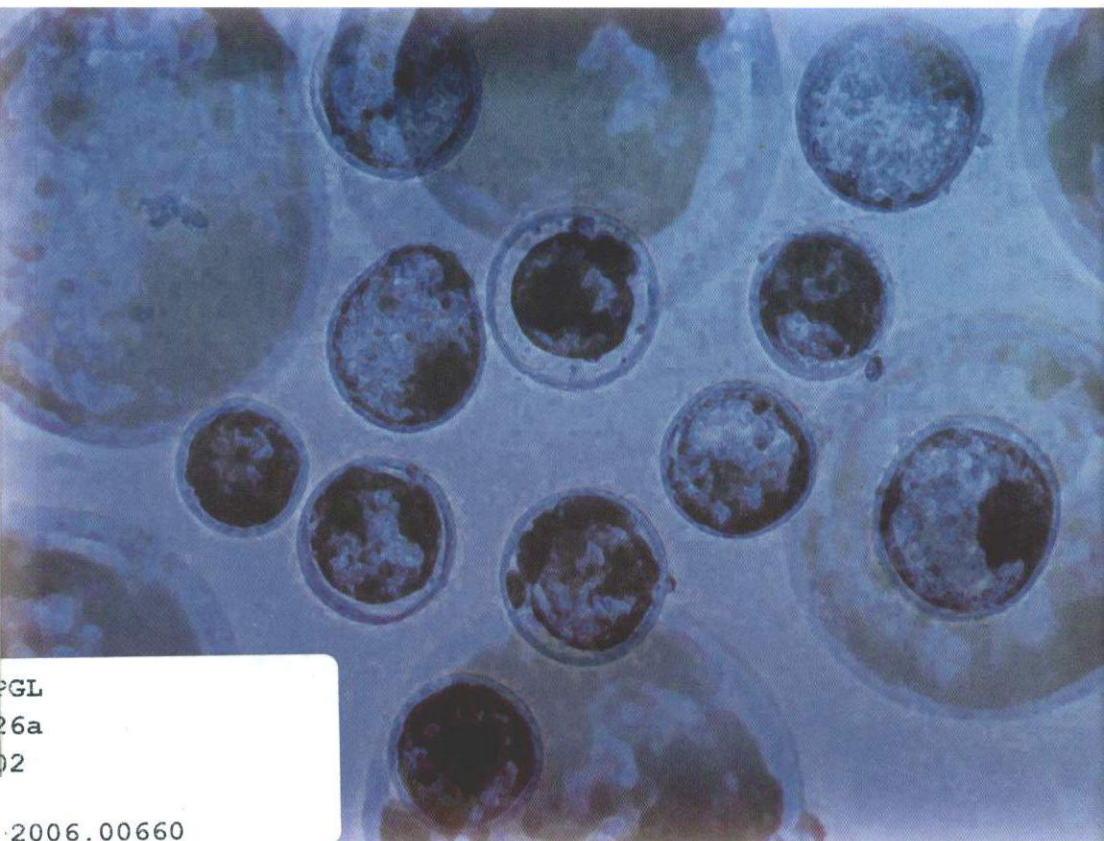


## Anais do *Workshop* sobre embriões bovinos produzidos in vitro: perspectivas de utilização e possíveis impactos na pecuária brasileira



PGL  
26a  
02

2006.00660

Anais...

2002

PC-2006.00660



35206-1

***República Federativa do Brasil***

*Luiz Inácio Lula da Silva*

Presidente

***Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

*Roberto Rodrigues*

Ministro

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária***

***Conselho de Administração***

*José Amauri Dimázio*

Presidente

*Clayton Campanhola*

Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*

*Dietrich Gerhard Quast*

*Sérgio Fausto*

*Urbano Campos Ribeiral*

Membros

***Diretoria-Executiva da Embrapa***

*Clayton Campanhola*

Diretor-Presidente

*Gustavo Kauark Chianca*

*Herbert Cavalcante de Lima*

*Mariza Marilena T. Luz Barbosa*

Diretores-executivos

***Embrapa Gado de Leite***

*Duarte Vilela*

Chefe-Geral

*Mário Luiz Martinez*

Chefe-adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Matheus Bressan*

Chefe-adjunto de Comunicação e Negócios

*Victor Ferreira de Souza*

Chefe-adjunto de Administração

ISSN 1516-7453

Dezembro, 2002

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

## ***Documentos 88***

### **Anais do *Workshop* sobre embriões bovinos produzidos in vitro: perspectivas de utilização e possíveis impactos na pecuária brasileira**

**Editores:**

**Ademir de Moraes Ferreira**

**Wanderlei Ferreira de Sá**

**Juiz de Fora, MG  
2002**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Gado de Leite**

Rua Eugênio do Nascimento, 610 - Bairro Dom Bosco

36038-330 Juiz de Fora - MG

Fone: (32)3249-4700

Fax: (32)3249-4751

Home page: <http://www.cnp.gl.embrapa.br>

E-mail: [sac@cnp.gl.embrapa.br](mailto:sac@cnp.gl.embrapa.br)

<b>Embrapa</b>	
Unidade:	AT-Sede
Valor aquisição:	
Data aquisição:	
N.º N. Fiscal/Fatura:	
Fornecedor:	
N.º OCS:	
Origem:	Doação
N.º Registro:	00660/06

Supervisão editorial: Angela de F.A. Oliveira e Ademir de Moraes Ferreira

Editoração eletrônica e tratamento das ilustrações: Angela de F.A. Oliveira

Revisor de texto: Newton Luís de Almeida

Normalização bibliográfica: Inês Maria Rodrigues

Capa: Marcella Fernandes Quintella Avila (estagiária)

1ª edição

1ª impressão (2002): 500 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

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

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.

Embrapa Gado de Leite

Anais do *Workshop* sobre embriões produzidos in vitro: perspectivas de utilização e possíveis impactos na pecuária brasileira / Ademir de Moraes Ferreira ... [et al.] (eds.). - Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2002.

91 p. : il. - (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 88).

Inclui bibliografia.

ISSN 1516-7453.

1. Bovinos - Embriões in vitro - utilização. 2. Pecuária brasileira - embriões bovinos in vitro - impactos. 3. PIVE. I. Ferreira, Ademir de Moraes, ed. II. Sá, Wanderlei Ferreira de, ed.

CDD-636.08926

© Embrapa 2002

# **Autores**

## **Ademir de Moraes Ferreira**

Médico-veterinário, Ph.D. – Embrapa Gado de Leite  
Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco  
– 36038-330 Juiz de Fora, MG  
ademirmf@cnpgl.embrapa.br

## **André Dayan**

Médico Veterinário, M.Sc. – Vitrogen – Av. Coronel  
José Nogueira Terra, 203 – 14140-000 Cravinhos – SP  
adayan@zaz.com.br

## **Carlos Fernandes Marins Rodrigues**

Médico-veterinário – Gertec Representação Assessoria e  
Produção de Embriões Ltda., Rua Antônio Giácomo José  
de Zardo, nº 60 – Bragança Paulista – SP

## **César Roberto Esper**

Professor, Ph.D. – Departamento de Med. Vet. Preventi-  
va e Reprodução Animal/FCAV/Unesp-Jaboticabal – Via  
de Acesso Prof. Paulo Donato Castellone s/nº – 14884-  
900 – Jaboticabal – SP

## **João Henrique Moreira Viana**

Médico Veterinário, Ph.D. – Embrapa Gado de Leite

Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco  
36038-330 Juiz de Fora, MG  
jhmviaana@cnpagl.embrapa.br

**Joaquim Mansano Garcia**

Professor, Ph.D. – Departamento de Med. Vet. Preventiva e Reprodução Animal/FCAV/Unesp-Jaboticabal – Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellone s/nº  
14884-900 – Jaboticabal – SP  
jmgarcia@fcav.unesp.br

**José Reinaldo Mendes Ruas**

Médico-veterinário, D.Sc. – Epamig – Centro Tecnológico da Zona da Mata – Campus da UFV, nºs 46 e 47 – Caixa Postal 216 – Via Gianetti – 36571-000 Viçosa – MG  
epamig@mail.ufv.br

**Karina Beloti Avelino**

Pós-Graduando – Medicina Veterinária/FCAV/Unesp-Jaboticabal – Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellone s/nº – 14884-900 – Jaboticabal – SP

**Luiz Sérgio de Almeida Camargo**

Médico Veterinário, M.Sc. – Embrapa Gado de Leite  
Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco  
36038-330 Juiz de Fora, MG  
camargo@cnpagl.embrapa.br

**Marcelo Marcondes Seneda**

Pós-graduanda – Medicina Veterinária/FCAV/Unesp-Jaboticabal – Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellone s/nº – 14884-900 – Jaboticabal – SP

**Marco Antonio Machado**

Engenheiro-agrônomo, Ph.D. – Embrapa Gado de Leite  
Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco  
36038-330 Juiz de Fora, MG  
machado@cnpagl.embrapa.br

**Marcos Fernando de Rezende Matta**

Professor, Ph.D. – Uenf – Laboratório de Melhoramento Genético Animal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias – Av. Alberto Lamego, 2000 – Parque Califórnia – 28013-600 Campos dos Goytacazes – RJ  
matta@uenf.br

**Margot Alves Nunes Dode**

Médica-veterinária, Ph.D. – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Sain Parque Rural – Av. Norte (Final) 70770-900 Brasília-DF – Caixa Postal: 0232  
margot@cenargen.embrapa.br

**Raquel Zaneti Puelker**

Pós-graduanda – Medicina Veterinária/FCAV/Unesp-Jaboticabal – Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellone s/nº – 14884-900 – Jaboticabal – SP

**Roberta Vantini**

Professora, Ph.D. – Departamento de Med. Vet. Preventiva e Reprodução Animal/FCAV/Unesp-Jaboticabal – Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellone s/nº – 14884-900 – Jaboticabal – SP

**Rodolfo Rumpf**

Médico-veterinário, Ph.D. – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Sain Parque Rural - Av. Norte (Final) – 70770-900 Brasília-DF – Caixa Postal 0232  
rodolfo@cenargen.embrapa.br

**Sílvia Graciela Torres Gilardi**

Médica-veterinária – Mestre – Universidade Federal Fluminense – Faculdade de Medicina Veterinária – Rua Vital Brasil, 64 – Santa Rosa – 24320-340 – Niterói, RJ

**Wanderlei Ferreira de Sá**

Médico-veterinário, Ph.D. – Embrapa Gado de Leite  
Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco  
36038-330 Juiz de Fora, MG  
wandefsa@cnppl.embrapa.br



# **Apresentação**

A realização de eventos de alta relevância para o agronegócio do leite, encontra-se dentro das diretrizes estratégicas definidas no II Plano Diretor da Embrapa Gado de Leite (PDU, 2000-2003), com a finalidade de promover intercâmbio científico, reunindo os mais experientes pesquisadores de órgãos públicos e empresas privadas, deixando como resultado o conteúdo dos trabalhos apresentados, além de posicionamentos e conclusões sobre os temas discutidos.

Com o objetivo de estruturar essa parceria, realizou-se o Workshop “Embriões bovinos produzidos in vitro: perspectivas de utilização e possíveis impactos na pecuária brasileira.”, com a pretensão de se discutir a situação de produção “in vitro” de embriões (PIVE) bovinos no Brasil, conhecer os resultados de vários laboratórios sobre a taxa de produção “in vitro” (PIV) de embriões, a eficiência na coleta in vivo de oócito e da taxa de gestação com o uso desses embriões. Além disso, levantou-se as dificuldades encontradas, limitações e perspectivas futuras dessa técnica no País, bem como se discutiu o potencial do uso das técnicas de sexagem de espermatozóides e embriões.

A Embrapa Gado de Leite e a Embrapa Milho e Sorgo estão concretizando uma parceria com a Epamig, visando formar uma equipe de reprodução inter-institucional para desenvolver trabalhos de pesquisas em Biotecnologias de Reprodução, mais especificamente na fecundação “in vitro” (FIV), visando melhorar a eficiência dessa técnica, para posteriormente assessorarem a implantação de Laboratórios Regionais de PIVE, com o objetivo final de abastecerem o Estado de Minas Gerais com embriões F1 (meio sangue HPB x Zebu), cuja demanda é cada vez mais crescente.

Foram definidos os principais pontos de estrangulamento no uso da PIVE, e o resultado desse proveitoso *Workshop* encontra-se nas páginas desse livro, que contém além das opiniões de cada pesquisador palestrante, as conclusões finais resultado de amplo debate efetuado no final do evento.

Esperamos que esse Anais possa efetivamente contribuir para o delineamento de novas metas de pesquisa na área em questão.

*Duarte Vilela*

Chefe-Geral

Embrapa Gado de Leite

# Sumário

## **1º painel: Eficiência, limitações e perspectivas futuras na produção in vitro de embriões bovinos ..... 11**

Produção in vitro de embriões – eficiência, limitações e perspectivas futuras: visão da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia ..... 13

Eficiência, limitações e perspectivas futuras na produção in vitro de embriões bovinos ..... 27

Produção in vitro de embriões bovinos na Embrapa Gado de Leite ..... 31

## **2º painel: Eficiência, problemas encontrados e perspectivas futuras no uso de embriões bovinos produzidos in vitro .. 37**

Utilização das técnicas de aspiração folicular e fecundação in vitro na reprodução bovina ..... 39

Punção folicular em bovinos da raça Gir: resultados, perspectivas e desafios ..... 53

### **3º painel: Sexagem de espermatozóides e de embriões .. 63**

Imunossexagem de espermatozóides ..... 65

Sexagem de embriões ..... 69

### **4º painel: Definição dos pontos de estrangulamento na técnica de produção in vitro de embriões – Conclusões do *Workshop* ..... 83**

Considerações sobre produção in vitro de embriões bovinos – conclusões do *Workshop*..... 85

# **1º painel: Eficiência, limitações e perspectivas futuras na produção in vitro de embriões bovinos**

## **Prelecionistas**

Margot Alves Dode  
Joaquim Mansano Garcia  
Luiz Sérgio de Almeida Camargo

## **Moderador**

Wanderlei Ferreira de Sá



# **Produção in vitro de embriões – eficiência, limitações e perspectivas futuras: visão da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

*Margot Alves Nunes Dode*

*Rodolfo Rumpf*

## **Introdução**

Com o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida em animais, tornou-se possível otimizar a utilização de fêmeas de interesse não só para a produção animal, mas também para a conservação de espécies em perigo de extinção. Várias biotécnicas de multiplicação animal foram desenvolvidas, algumas já estabelecidas e amplamente usadas no setor produtivo, enquanto outras estão ainda em desenvolvimento, sendo todas aditivas e não-substitutivas. Convém ressaltar também que o conceito de técnica desenvolvida ou em desenvolvimento é relativo, visto que, sendo a ciência dinâmica, sempre haverá espaço para o aprimoramento e melhora nos índices, mesmo daquelas que já estão sendo utilizadas rotineiramente.

Dentre essas técnicas, a produção in vitro de embriões (PIVE) surge como uma nova opção para a multiplicação animal, não só pelo seu potencial de aumentar, consideravelmente, o número de produtos/vaca/ano, mas também porque abre a possibilidade de utilizar bezerras pré-púberes, vacas em início de gestação, vacas com subfertilidade adquirida e vacas senis.

A PIVE, inicialmente, se resumia à fecundação in vitro (FIV), entretanto, após o nascimento do primeiro bezerro em 1981 (Brackett et al., 1982), avanços consideráveis foram obtidos. Atualmente, essa tecnologia se refere à combinação de vários processos interdependentes, que vão desde a obtenção dos ovócitos imaturos até à transferência dos embriões para as fêmeas receptoras, que levarão a gestação a termo.

## Aplicações e perspectivas da PIVE

Apesar de a transferência de embriões (TE) ter proporcionado um melhor aproveitamento de matrizes de elevado mérito genético, somente com o advento da PIVE é que esse potencial de multiplicação se tornou significativo. A aspiração de ovócitos imaturos diretamente dos folículos ovarianos, associada à maturação e fecundação in vitro desses, e ao cultivo in vitro dos embriões, permite que seja produzida, em média, uma cria por semana de uma única fêmea. Além disso, o estabelecimento da PIVE viabiliza o desenvolvimento de técnicas como a clonagem por transferência nuclear, a injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) e a transgenia (Rumpf et al., 2000a,b).

Ovários de abatedouro, apesar de constituírem importante fonte de ovócitos para uso na pesquisa, são geralmente provenientes de animais sem valor econômico. Entretanto, o desenvolvimento do método de punção folicular transvaginal (OPU) tem possibilitado a recuperação de ovócitos de animais vivos, permitindo a produção de embriões de fêmeas de várias idades e diferentes estágios fisiológicos.

O uso comercial dessa técnica ainda está limitado ao custo e vai depender do balanço entre o mérito genético do produto (bezerro) e o custo de sua produção. Entretanto, apesar de o custo ainda ser alto, a PIVE está sendo gradualmente integrada a programas de melhoramento genético, como uma ferramenta complementar para a inseminação artificial (IA) e a TE.

Em termos práticos, o potencial da PIVE fica mais evidente quando se discutem suas diferentes aplicações. À medida que o sistema PIVE melhora, novas alternativas surgem, como a criopreservação do ovócito e do embrião, a identificação do sexo dos embriões previamente à transferência, a bipartição destes visando à produção de gêmeos monozigóticos e à melhoria dos índices de gestação mediante a transferência dos pares para a mesma receptora. No entanto, o maior impacto da PIVE será a sua aplicação associada a sexagem de espermatozóides. Isso porque, com uma dose inseminante sexada será possível produzir várias gestações. Portanto, verdadeiras linhas de produção de embriões sexados poderão ser montadas para a produção de fêmeas, machos e animais com grau de sangue fixo, como por exemplo o caso da Girolanda F1.

## Eficiência e limitações

A média de ovócitos viáveis obtidos por coleta in vivo é em torno de oito, entretanto essa média depende da estratégia adotada. Assim, é possível

puncionar os folículos de uma doadora duas vezes por semana, uma vez por semana ou uma vez a cada duas semanas, sendo nas duas últimas alternativas possível dobrar os resultados mediante a estimulação hormonal (Goodhand et al., 1999). Independentemente da estratégia, o resultado final esperado é de pelo menos uma gestação por semana por doadora (Peixer et al., 2000a,b; Bousquet et al., 2000).

Considerando que ovócitos maturados in vitro, quando comparados aos in vivo apresentam menores taxas de blastocisto após a fecundação e o cultivo in vitro (Takagi et al., 2001), pode-se supor que a maturação ainda continua sendo um problema na PIVE. Vários fatores podem afetar o sucesso da maturação ovocitária, entre eles podemos citar a morfologia do complexo cumulus-ovócito (CCO), as condições de maturação e a competência do ovócito.

Comparando os embriões produzidos in vitro e os produzidos in vivo, foi observado que eles diferem em várias características, tais como aspectos morfológicos, aspectos metabólicos, alterações cromossômicas, número de células e expressão de RNAm específicos (Van Soom et al., 1996; Viuff et al., 1999, 2000). Essas diferenças, possivelmente, determinam o começo de uma série de problemas que levam uma redução na eficiência da técnica (Farin et al., 2001). Os embriões PIV apresentam maior vacuolização, menor número de células, menor densidade de mitocôndrias, maior densidade de lipídios (Crosier et al., 2001) e junções incompletas entre as células do botão embrionário e trofoblasto (Farin et al., 2001). Além de apresentarem alta percentagem de mixoploidia e poliploidia (Viuff et al., 1999, 2000, 2001).

Muitos desses problemas são devido ao processo de maturação, mas que se manifestam no desenvolvimento embrionário, visto que o número de células e alterações cromossômicas, por exemplo, são diferentes quando os embriões PIV são produzidos a partir de ovócitos maturados in vivo e in vitro (Van Soom et al., 1996; Viuff et al., 2000, 2001).

Na PIVE cerca de 30-50% dos ovócitos inseminados chegam ao estágio de blastocisto e os índices de gestação estão em torno de 35% (Dayan et al., 2000). As maiores perdas no desenvolvimento embrionário ocorrem nos estágios de oito para 16 células (ativação do genoma do embrião) e pós-transferência, em torno de 14 e 15 dias da gestação. Quando embriões PIV ou in vivo foram transferidos no sétimo dia pós-inseminação e recuperados no

décimo sétimo dia da gestação, foi observado que a degeneração e perda embrionária foi maior nos embriões PIV (Farin et al., 2001). Esse período coincide com o reconhecimento materno da prenhez, o qual depende de um sinal enviado pelo embrião, o interferon-t, ao organismo materno. De fato, tem sido demonstrado que embriões PIV secretam quantidades menores de interferon-t do que os in vivo, sendo a secreção menor quanto pior a qualidade morfológica do embrião (Stojkovic et al., 1999). Os problemas mencionados são, provavelmente, os responsáveis pela maior sensibilidade dos embriões PIV à criopreservação, que juntamente com a dificuldade de criopreservar ovócitos constituem-se em uma das grandes limitações para maior utilização dessa técnica no setor produtivo.

Além disso, outras limitações podem ser citadas, tais como a menor viabilidade dos ovócitos obtidos de bezerras em relação aos de vacas e novilhas; a possibilidade de provocar lesões nos ovários após repetidas aspirações e o custo do embrião que é ainda superior ao de um embrião de TE.

## **PIVE na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

O Laboratório de Reprodução Animal (LRA) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia utiliza a produção in vitro de embriões (PIVE) em várias pesquisas para aprimoramento, monitoramento e utilização dessa técnica para o suporte das demais. Desta forma, tem realizado estudos referentes à maturação ovocitária (Dode et al., 2000b,c; Dode et al., 2001a,b; Cordeiro, 2001), fecundação (Dode et al., 2002a), desenvolvimento embrionário (Dode et al., 2002b), criopreservação de ovócitos (Luna, 2001; Brandão, 2001a), avaliação in vitro da fertilidade de touros (Dode et al., 2000a; Mattarazo et al., 1999; Pereira et al., 2002), sexagem de sêmen (Peixer et al., 2001), injeção intracitoplasmática de espermatozóides (Salles, 2000; Martins et al. 2001a,b), clonagem e transgenia (Rumpf et al., 2000a,b; Rumpf et al., 2001).

Os estudos na PIVE tiveram início em 1990, e essa equipe obteve, em 1994, seu primeiro produto produzido totalmente in vitro. Em 1996 nasceram os primeiros produtos por aspiração folicular associada à FIV, e em 2000 um produto produzido in vitro a partir de ovócito oriundo de punção folicular de uma bezerra com três meses de idade.

Com o sistema utilizado pelo LRA, os índices médios obtidos atualmente são de 5-6 ovócitos viáveis/ ovário de abatedouro, de 10-11 ovócitos por sessão de punção em vacas vivas, 70-80% de clivagem e 40% de blastocisto. Entretanto, convém salientar que existe uma grande variação na produção de blastocistos, devido não só a doadora, mas também ao sêmen usado.

No que se refere à utilização da PIVE propriamente dita, o LRA tem desenvolvido estudos visando melhorar a qualidade e quantidade de ovócitos recuperados. Foram realizados experimentos avaliando o efeito da retenção da meiose e avaliação de síntese protéica durante o período de retenção pelos ovócitos e células do *cumulus*. A retenção da meiose por vários períodos de tempo em que se usaram inibidores da proteína quinase, líquido folicular e cultivo intrafolicular de ovócitos, mostrou que não melhora a qualidade dos ovócitos, visto que não foi observado um aumento na taxa de produção de blastocisto in vitro (Dode et al., 1999; Dode et al., 2000c; Dode & Adona, 2001). Entretanto, estudos do proteoma das células do cumulus durante o período de maturação demonstraram que ocorre mudança no padrão de síntese protéica, sendo algumas proteínas estágio-específicas indicando que mais estudos são necessários para entendimento dos mecanismos que ocorrem durante a retenção da meiose e a maturação ovocitária (Cordeiro et al., 2001).

A influência do FSH, GnRH e BST no recrutamento folicular e na qualidade dos ovócitos, visando aumentar a taxa de blastocisto, foi também avaliada. Os dados obtidos demonstraram que ovócitos recuperados após 20 horas da aplicação do GnRH, em um esquema de sincronização de onda folicular e estímulo com FSH, apresentaram maior potencial de desenvolvimento quando comparados aos recuperados após dez horas. O BST, por sua vez, aumentou o número de folículos, o número e a qualidade dos ovócitos recuperados, com tendência a aumentar a taxa de blastocisto (Pivato, 2001).

A possibilidade de produção de bezerras de fêmeas de dois a três meses de idade é de grande interesse, visto que o intervalo entre gerações pode ser significativamente reduzido, propiciando ganho genético elevado do rebanho em um menor período de tempo, quando comparado com o teste de progênie convencional. Visando avaliar o potencial de produção de blastocistos a partir de ovócitos obtidos de bezerras, foram realizadas pesquisas com bezerras Nelore de dois a três meses de idade utilizando procedimento cirúrgico. A média de ovócitos recuperados foi de 21/bezerra, com taxas de clivagem, mórula e blastocisto de 41,6%, 10,0% e 1,6%, respectivamente (Malard, 2000). Dos

embriões produzidos a partir de ovócitos aspirados dessas bezerras, cinco foram transferidos para vacas receptoras. A transferência resultou no nascimento de um bezerro. Esses resultados sugerem que bezerras a partir de dois meses de idade possuem potencial para serem doadoras de ovócitos. Entretanto, taxas de desenvolvimento embrionário in vitro são ainda baixas quando comparadas às alcançadas em vacas adultas. Estudos de ovócitos de bezerras precisam ser intensificados para que se possa definir protocolos de estimulação hormonal e alcançar os índices de produção desejados.

Da mesma forma, foi também avaliado o potencial de produção de ovócitos de novilhas Nelore pré-púberes de dez meses de idade, utilizando-se punção folicular (PF) por via transvaginal guiada por ultra-som. A taxa de recuperação foi em torno de 80% e a porcentagem de ovócitos viáveis de 70%, demonstrando que esse método pode ser utilizado em bezerras Nelore de dez meses de idade. A avaliação histológica dos ovários dessas novilhas mostrou fibrose capsular em todos os ovários examinados, além de ausência ou pequenas quantidades de folículos primordiais e primários na região do córtex logo abaixo do espessamento da cápsula. Além disso, foi observada presença de folículos atrésicos, corpos fibrosos e áreas circunscritas de cicatrização (Snel-Oliveira, 2001).

Uma linha de pesquisa fundamental para o LRA é a criopreservação de gametas, visto que uma das metas básicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia é a preservação e multiplicação de material genético, seja de espécies em perigo de extinção seja de animais geneticamente superiores, visando à formação de banco de germoplasma animal. Os trabalhos relativos à criopreservação de ovócitos de bovinos estão direcionados para estabelecimento e emprego da técnica de vitrificação usando o método de OPS (open pulled straw), segundo Vajta et al. 1998. Vários estudos têm sido realizados na busca de alternativas que possam diminuir os danos causados pela criopreservação em ovócitos, tais como criopreservação em diferentes tempos de maturação e combinação de crioprotetores. A avaliação dos danos cromossômicos causados pela exposição à solução de vitrificação, em ovócitos vitrificados às 0, 8, 12 ou 22 horas de maturação, mostrou que a exposição à solução crioprotetora utilizada não alterou a frequência de aneuploidia nos ovócitos bovinos estudados (Luna, 2001). Entretanto, quando os ovócitos bovinos foram vitrificados em vários momentos de maturação, e retornaram ao cultivo para finalizar a maturação, foram observadas várias alterações nucleares tais como diploidias e condensação atípica da cromatina, assim como lesões na membrana plasmática dos ovócitos vitrificados (Brandão et al., 2001a,b).

Além dos estudos que visam aprimorar e monitorar a técnica de PIVE, propriamente dita, várias outras biotécnicas que dependem de sistema eficiente de PIVE são também pesquisadas. Uma área bastante ativa no LRA é a clonagem por transferência nuclear, a qual também depende de um eficiente sistema de PIVE. Inicialmente eram utilizadas células embrionárias como doadoras de núcleos; após o estabelecimento da técnica com nascimento de um produto (Sousa et al., 2000, Rumpf et al., 2001), passou-se então a utilizar fibroblastos adultos e fetais como doadores de núcleo (Oliveira et al., 1999, Iguma et al., 2001).

Concomitantemente com os estudos de transferência nuclear usando fibroblastos, estão sendo iniciados os trabalhos de transgenia. Nesse caso, os fibroblastos utilizados como doadores de núcleo estão sendo geneticamente modificados antes de serem empregados para transferência nuclear (Oliveira et al., 2001).

Dentre as técnicas empregadas e que dependem da PIVE, destaca-se também a produção de embriões pela injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI). Essa técnica é prioritária como estratégia de regeneração de material genético raro de macho. Os estudos iniciais envolvendo essa técnica visavam ao estabelecimento dela (Salles et al., 2000). Nesses, foram estabelecidos alguns parâmetros tais como o tempo de maturação in vitro de ovócitos bovino mais adequado para a realização da ICSI, sistema e melhor momento de ativação, entre outros.

Além disso, a avaliação do potencial de produção de embriões pela PIVE e ICSI usando sêmen do ejaculado e do epidídimo demonstrou que ambos podem ser utilizados em detrimento da taxa de embriões produzidos (Martins et al., 2000). Os resultados também mostraram que os espermatozóides do epidídimo são similares aos do ejaculado e podem ser criopreservados para posterior utilização (Martins et al., 2001a,b). As espermátides, por apresentarem potencial para produção de embriões, quando microinjetadas em um ovócito maduro, constituem-se em uma opção para conservação animal. O isolamento e identificação das células espermatogênicas (Martins et al., 2001c) a partir de animais mortos mostrou que vários tipos podem ser isolados e se manter viáveis por a 4°C por até 120 horas, para uso futuro (Martins et al., 2002).

## Considerações finais

A produção in vitro de embriões surge como mais uma ferramenta para o melhoramento animal, pois otimiza a utilização das fêmeas, por aumentar a sua produção. Apesar de o custo ainda ser elevado, a aspiração associada à PIVE está sendo gradualmente integrada aos esquemas de seleção e melhoramento

genético como uma complementação da IA e TE. Considerando que a aspiração pode ser feita a campo, enquanto a PIVE requer laboratório adequado, o que está ocorrendo hoje no Brasil, semelhante a outros países, é a formação de laboratórios regionais de PIVE que recebem os ovócitos aspirados por veterinários treinados. No laboratório os embriões são produzidos in vitro e são entregues aos veterinários que os transferem para vacas receptoras. Tornando, desta forma, essa técnica acessível aos produtores interessados.

Apesar dos avanços atingidos, vários aspectos precisam ser ainda esclarecidos. As questões estão associadas à avaliação da competência biológica dos gametas e ao próprio sistema de cultivo. Estudos básicos sobre os diversos mecanismos envolvidos estão sendo conduzidos em laboratórios nacionais e internacionais. Os resultados desses estudos esclarecerão os aspectos relativos à maior susceptibilidade dos embriões PIV à criopreservação; à menor viabilidade dos ovócitos de bezerras quando comparados aos de vacas e às baixas taxas de prenhez, permitindo com isso aumentar os índices de produção e conseqüentemente reduzir os custos.

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

## Bibliografia

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

BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DONAWICK, W. J. et al. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod*, v. 27, p. 147-158, 1982.

BRANDÃO, D. O. Vitrificação de ovócitos bovinos em diferentes momentos da maturação in vitro. Belo Horizonte, MG: UFMG, 2001, 61p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2001a.

BRANDÃO, D. O.; BARAVIERA, T. T.; RUMPF, R. Effect of maturation stages on membrane integrity of bovine oocytes vitrified by the open-pulled straw method. *Biol Reprod.*, v. 64, p. 314, 2001b.

CROSIER, A. E.; FARIN, P. W.; DYKSTRA, M. J.; ALEXANDER, J. E. et al. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biol. Reprod.*, v. 64, p. 1375-1385, 2001.

DAYAN, A.; WATANABE, M. R., WATANABE, Y. F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 15 2000, Rio Quente: [ Anais... ]. Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, v. 28, n. 1, p. 181-185, 2000. Suplemento.

DODE, M. A. N.; GODOY, K.; ADONA, P. R.; FERNANDES, C. Inibição da meiose em ovócitos bovinos cultivados na presença de meios folículos e folículos inteiros. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 14., 1999, Campos do Jordão: [ Anais... ]. Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, v. 27, n. 1, p. 229, 1999. Suplemento.

DODE, M. A.; CHIOCHETTA, L.; RODOVALHO, N. C. M.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Teste de penetração de ovócitos: associação com características seminais (Resultados preliminares). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 15 2000, Rio Quente: [ Anais... ]. Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, v. 28, n. 1, p. 242, 2000a. Suplemento.

DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C. M.; UENO, V. G.; ALVES, R. G. O. Efeito do tamanho do folículo na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de fêmeas zebuínas. *Pesq. Agropec. Bras.* v. 35. p. 207-217, 2000b.

DODE, M. A. N., ADONA, P. R., RODOVALHO, N. C. M. Retenção da meiose de ovócitos bovinos em líquido folicular de folículos de vários tamanhos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 15., 2000, Rio Quente: [ Anais... ]. Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, v. 28, n. 1, p. 241, 2000c. Suplemento.

DODE, M. A. N.; ADONA, P. R. Developmental capacity of *bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. *Anim Reprod Science*, v. 65, p. 157-170, 2001a.

DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C.; UENO, V. G.; ALVES, R. G. A. Number and morphology of oocytes obtained from ovaries of zebu cows according to follicle size, physiological status and season. *Archivos de Zootecnia*, v. 50, p. 415-418, 2001b.

DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C.; UENO, V. G.; ALVES, FERNANDES, C.E. The effect of sperm preparation and time of co-incubation on in vitro fertilization of *Bos indicus* oocytes. *Anim Reprod Scien*, v. 69, p. 15-23, 2002a.

DODE, M. A. N.; MATTOS, L.; RUMPF, R. In vitro production of embryos in SOF medium under high oxygen tension. *Theriogenology*, v. 57, p. 661, 2002b.

CORDEIRO, D. Estabelecimento da técnica de análise de proteoma de complexos cumulus ovócitos bovinos bloqueados ou não com 6-dimetilaminopurina durante a maturação in vitro. Brasília, DF: UnB, 2001. 105p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2001

FARIN, P.; CROSIER, A. E.; FARIN, C. E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology*, v. 55, p. 151-170, 2001.

GOODHAND, K. L.; WATT, R. G.; STAINES, M. E.; HUTCHINSON, J. S. M. et al. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology*, v. 51, p. 951-961, 1999.

IGUMA, L.; SOUSA, R. V.; RUMPF, R. Efeito de diferentes passagens no cultivo in vitro de células somáticas quando utilizadas na transferência nuclear em bovinos. I: ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 6, 2001, Brasília: [ Anais... ]. Embrapa, Brasília, p. 118, 2001.

LUNA, H. S. Estudo citogenético em ovócitos bovinos resfriados ou vitrificados em diferentes tempos de maturação in vitro. Brasília, DF: UnB, 2001. 122p. Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2001.

MALARD, P. F. Coleta, maturação, fecundação e cultivo in vitro de ovócitos de bezerras da raça Nelore de 2 a 3 meses de idade. Belo Horizonte, MG: UFMG, 2000, 47p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.

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

MARTINS, C. F.; FELICIANO SILVA, A. E. D.; RUMPF, R.; UNANIAN, M. M. Produção de embriões bovinos por injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) do ejaculado e do epidídimo. In: I CONGRESSO DE INTEGRAÇÃO EM BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO, 1, 2001, Ribeirão Preto: [Anais...], p. 19-23, 2001a.

MARTINS, C. F.; FELICIANO SILVA, A. E. D.; RUMPF, R.; UNANIAN, M. M.; MATTOS, L. M. Utilização da técnica de injeção intracitoplasmática para avaliação do potencial de fecundação de espermatozoides do ejaculado e epidídimo bovino. In: XXXVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNICA, 38, 2001, Piracicaba: [Anais...], p. 23-26, 2001b.

MARTINS, C. F.; FELICIANO SILVA, A. E. D.; RUMPF, R. Isolation, identification, assesment of chromatin integrity and storage of bovine spermatogenic cells for use in assisted reproduction. *Theriogenology*, v. 55, p. 446, 2001c.

MARTINS, C. F.; FELICIANO SILVA, A. E. D.; RUMPF, R. Fertilization of bovine oocytes by refrigerated spermatids injection. *Theriogenology*, v.57, p.756, 2002.

MATARAZZO, R.; FELICIANO SILVA, A.E.D.; RUMPF, R. Teste de penetração de espermatozoide na zona pelúcida de ovócitos e hemi-zonas (HZ), como método de avaliação do sêmen descongelado de touros em preservação (resultados parciais). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 14., 1999, Campos do Jordão: [ Anais... ]. Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, v. 27, n. 1, p. 259, 1999. Suplemento.

OLIVEIRA, R. R.; RUMPF, R.; LUNA, H. S. et al. Isolamento, cultivo e criopreservação de fibroblastos fetais bovinos. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE – SIRGEALC, 2., 1999, Brasília. *Anais...* Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. CD-ROM. Editado por Arthur da Silva Mariante e Patrícia Goulart Bustamante.

OLIVEIRA, R. R.; LISAUSKAS, S.; CARVALHO, D. M.; VIANNA, G. R.; DODE, M. A. N.; ARAGÃO, F. J. L.; RUMPF, R.; RECH, E. L. High-frequency transfection of bovine and ovine fibroblast. In: 47º CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 47., 2001, Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Genética, 2001.CD-ROM.

PEIXER, M. A. S.; DODE, M. A. N.; RUMPF, R. Produção in vitro de embriões bovinos. In: *Workshop sobre Reprodução Animal*, 1, 2000, Pelotas: [Anais]. Embrapa ClimaTemperado, 2000a. p. 95-99.

PEIXER, M. A. S.; DODE, M. A. N.; RUMPF, R. Produção in vitro de embriões - visão da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 15 2000, Rio Quente: [Anais...]. Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, v. 28, n. 1, p. 175, 2000b. Suplemento.

PEIXER, M. A. S.; SILVA, A. E. D. F.; SOUSA, R. V.; MATTOS, L. M.; UNANIAN, M. M. Produção de embriões bovinos in vitro utilizando sêmen descongelado e sexado por gradiente de densidade (Resultado. Preliminares). Anais da 38ª Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia, p. 445-447, 2001.

PEREIRA, D. C.; DODE, M. A. N.; BARAVIERA, T. T.; PEIXER, M. A. S.; FELICIANO SILVA, A. E. D. competitive oocyte binding assay to evaluate bull fertility. *Theriogenology*, v. 57, p. 680, 2002.

PIVATO, I. Efeito de diferentes tratamentos hormonais e da nutrição em doadoras de ovócitos na produção de embriões in vitro. Pelotas, RS: UFPEL, 2001, 62p. Dissertação (Doutorado) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, 2001.

RUMPF, R.; DODE, M. A. N.; SILVA, A. E. D. F. Avanços na biotecnologia da reprodução dos bovinos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, 3, 2000a, Belo Horizonte: [Anais...]. Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2000a. p. 248-253.

RUMPF, R.; DODE, M. A. N.; BRANDÃO, D.; PEIXER, M. A. Multiplication biotechniques in the conservation of female germplasm: The Embrapa genetic Resources and Biotechnology Experience. In: *GLOBAL CONFERENCE ON CONSERVATION OF DOMESTIC ANIMAL GENETIC RESOURCES*, 5, 2000,

Brasília. Proceedings. Brasília: Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, 2000b. CD-ROM.

RUMPF, R.; IGUMA, L. T.; SOUSA, R. V. Produção de clones pela transferência nuclear em bovinos. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*, v. 22, p. 16-24, 2001.

SALLES, H. O. Injeção intracitoplasmática de espermatozóide em ovócitos bovinos maturados in vitro. Brasília, DF: UnB, 2000. 53p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2000.

SNEL-OLIVEIRA, M. V. Punção folicular por via transvaginal em bezerras pré-púberes da raça Nelore: Estimulação hormonal e lesões ovarianas. Brasília, DF: UnB, 2001. 104p Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2001.

SOUSA, R. V.; IGUMA, L. T.; NASCIMENTO, N.; CARMO, T. F. M.; RUMPF, R. Clonagem de embriões bovinos congelados utilizando citoplasmas receptores pré-ativados. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 15 2000, Rio Quente: [ Anais... ]. Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, v. 28, n. 1, p. 335, 2000. Suplemento.

STOJKOVIC, M.; BÜTTNER, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; RIEDL, J. et al. Secretion of interferon-tau by bovine embryos in long-term culture: comparison of in vivo derived, in vitro produced, nuclear transfer and demi-embryos. *Anim.Reprod.Sci.*, v. 55, p. 151-162, 1999.

TAKAGI, M.; KIM, I. H.; IZADYAR, F.; HYTTEL, P.; BEVERS, M. M. et al. Impaired final follicular maturation in heifers after superovulation with recombinant human FSH. *Reproduction*, v. 121, p. 941-951, 2001.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M. et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol.Reprod.Dev.*, v. 51, p. 53-58, 1998.

VAN SOOM A.; BOERJAN, M. L.; YSEBAERT, M. T.; KUIF, A. Cell allocation to the inner cell mass and the trophoctoderm in bovine embryos cultured in two different media. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 45, p. 171-182, 1996.

VIUFF, D.; RICKORDS, L.; OFFENBERG, H.; HYTTEL, P. et al. A high proportion of bovine blastocyst produced in vitro are mixiploid. **Biol Reprod**, v. 60, p.1273-1278, 1999.

VIUFF, D., GREVE, T., AVERY, B., HYTTEL, P. et al. Chromosome aberrations in in vitro-produced bovine embryos at days 2-5 post-insemination. **Biol.Reprod**, v. 63, p. 1143-1148, 2000.

# **Eficiência, limitações e perspectivas futuras na produção in vitro de embriões bovinos**

*Joaquim Mansano Garcia, César Roberto Esper,  
Raquel Zaneti Puelker, Karina Beloti Avelino,  
Roberta Vantini, Marcelo Marcondes Seneda e  
Carlos Fernandes Marins Rodrigues*

A produção in vitro de embriões bovinos passou a ter maior aplicação comercial após o início das aspirações foliculares guiadas pelo ultra-som. Visto que esta técnica permite aspirações foliculares sucessivas sem aparente comprometimento para a vida e o aparelho reprodutor feminino. Com objetivo de avaliar a capacidade de vacas com transtorno reprodutivo adquirido, em produzir embriões in vitro, realizamos aspirações foliculares em animais sem estimulação para crescimento folicular (sem estimulação) ou controle da onda folicular utilizando como agentes sincronizadores o dispositivo de progesterona intravaginal (CIDR®) e a aspiração do folículo dominante ou injeção de 17-B estradiol (2,5 mg) ou Benzoato de estradiol (1 mg); seguido de estimulação com FSH (Plust® ou Foltropin®) e posterior aspiração folicular, para avaliação da taxa de recuperação qualidade do oócito recuperado, taxa de clivagem e competência no desenvolvimento embrionário, seguindo o protocolo:

- dia zero, colocação do dispositivo de progesterona intravaginal, independentemente da fase do ciclo estral do animal (CIDR® com 1,9 g de progesterona);
- dia 1, controle da onda utilizando um dos métodos (aspiração do folículo dominante ou 17-B estradiol ou benzoato de estradiol);
- dia 5, estimulação da onda folicular com dose única de 200 UI de FSH (PLUST® ou Foltropin®);
- dia 8, aspiração dos folículos acima de 3 mm, procura dos oócitos, classificação e início do cultivo de maturação;
- dia 9, fecundação in vitro;

- dia 10, início do cultivo de desenvolvimento;
- dia 16, avaliação do desenvolvimento embrionário e transferência dos embriões para as receptoras sincronizadas;
- dia 17, congelamento das estruturas excedentes.

Nos procedimentos de aspiração folicular foram utilizadas agulhas "Cook" de 55 cm de comprimento e calibre de 17G, uma probe convexa acoplada ao guia de aspiração de um ultra-som da marca "Aloka", modelo SSD500.

Nas 358 sessões de aspiração folicular foram recuperados 3.928 óócitos (em média 10,97 óócitos por sessão), distribuídos em *cumulus* compacto com mais de quatro camadas de células da granulosa "GI" (1.645 óócitos, 41,88%), *cumulus* compacto com duas a quatro camadas de células da granulosa "GII" (1.095 óócitos, 27,88%), apenas uma camada de *cumulus* de células da granulosa "GIII" (527 óócitos, 13,42%), desprovidos de pelo menos uma camada de *cumulus* de células "Desnudos" (270 óócitos, 6,87%) e *cumulus* atresico (391 óócitos, 9,95%). Do total de recuperados, 3.376 óócitos (85,95%) foram cultivados para maturação, 146 óócitos (3,71%) contaminaram durante a maturação, os demais foram submetidos a fecundação e, ao serem avaliados 40 horas após, resultaram em 2.216 (65,64%) estruturas de duas a quatro células.

O cultivo de desenvolvimento foi realizado em microgotas de 100  $\mu$ l de meio 199 suplementado com 10 mg de BSA livre de ácidos graxos/ml de meio e 10% de SFB em co-cultivo com células da granulosa ou em meio DRA suplementado com 10 mg de BSA livre de ácidos graxos/ml de meio. O meio renovado em 70% a cada 48 horas até o 8º dia de cultivo na temperatura de 38,5-38,7°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar. No transcorrer do cultivo de desenvolvimento embrionário, constatou-se que 108 estruturas (4,87% das clivadas) degeneraram em razão da contaminação das gotas. As demais 2.108 estruturas (95,13% das clivadas) foram mantidas em cultivo e avaliadas quanto ao desenvolvimento no 7º dia, quando foi constatado que 1.220 estruturas (55,05%) não atingiram o desenvolvimento mínimo para transferência e foram considerados como degenerados, as demais 996 estruturas (44,95%) haviam desenvolvido para mórula (221 estruturas, 22,19%), blastocisto (607 estruturas, 60,94%) e blastocisto expandido (168 estruturas, 16,87%).

Dentre os embriões que desenvolveram, 678 foram transferidos por método não-cirúrgico para receptoras sincronizadas com a cronologia dos embriões (139 mórulas, 447 blastocistos e 92 blastocistos expandidos), resultando em 234

(34,51%) gestações com 28-30 dias, 28 (11,97%) mortalidades até os 60 dias, portanto confirmando 206 (30,38%) gestações.

Nas aspirações foliculares sem o controle prévio da onda folicular e estimulação com FSH de 27 sessões, obtivemos 220 oócitos (8,15/sessão). Destes 96 clivaram (3,56/sessão) e 55 desenvolveram para mórula e blastocisto (2,04/sessão).

Nos tratamentos em que os animais receberam Progesterona, as ondas foliculares sincronizadas e depois estimuladas com FSH apresentaram os resultados mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resultados de aspiração folicular, fecundação e desenvolvimento embrionário até mórula e blastocisto após controle da onda folicular e estimulação com FSH.

	Tratamentos		
	Aspiração do folículo dominante	Injeção de benzoato de estradiol	Injeção de 17 $\beta$ estradiol
Nº de sessões	39	200	56
Nº de oócitos (sessão)	427 (10,95)	2.288 (11,44)	488 (8,71)
Nº de maturados (sessão)	375 (9,62)	1.977 (9,89)	408 (7,29)
Nº de desnudos (Sessão)	15 (0,38)	116 (0,58)	32 (0,57)
Nº de atresícos (sessão)	37 (0,95)	204 (1,02)	48 (0,86)
Nº de clivados (sessão)	277 (7,10)	1.235 (6,18)	180 (3,21)
Nº de embriões desenvolvidos (sessão)	82 (2,10)	683 (3,42)	89 (1,59)

Nas estimulações com FSH foram utilizados dois produtos comerciais, Plust<sup>®</sup> ou Foltropin<sup>®</sup>, os resultados de produção de embriões in vitro estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Resultados de aspiração folicular, fecundação e desenvolvimento embrionário in vitro após estimulação ovariana com duas fontes de FSH.

	Tratamentos					
	Foltropin-V <sup>®</sup>			Pluset <sup>®</sup>		
	Número	%	Média	Número	%	Média
Sessões	220	-	-	146	-	-
Total de oócitos	2.331	-	10,60	1.894	-	12,97
Oócitos maturados	1.946	83,48	8,85	1.627	85,90	11,14
Oócitos desnudos	138	5,92	0,63	83	4,38	0,57
Oócitos atresícos	247	10,60	1,12	184	9,71	1,26
Clivados	1.060	54,47	4,82	1.043	64,11	7,14
Embriões desenvolvidos	633	59,72	2,88	392	37,58	2,68

Os embriões excedentes que desenvolveram até blastocisto ou blastocisto expandido foram congelados para transferência direta em 1,5 mM de etileno glicol ou pelo método tradicional em glicerol. Dos 221 embriões transferidos, apenas 40 resultaram em gestação, apresentando, portanto, a taxa de 18,1% de gestação.

Durante o processo de sexagem fetal constatamos a incidência de 64% de fetos machos e durante o desenvolvimento da gestação, foram observadas anomalias placentárias: hidroalantóide e menor número de placentomas. Ao nascimento constatamos 24 bezerros nascidos com mais de 50 kg (um com mais de 75 kg) e as anomalias de fetos xifópagos (duas fêmeas) e diplocefalia (um caso). Em relação aos neonatos, foram registradas 17 mortes logo após o nascimento, com quadro clínico de dispnéia e hipertermia.

Os resultados de produção in vitro de embriões bovinos, taxa de gestação aos 28-30 dias, taxa de mortalidade embrionária, anomalias fetais, anomalias pós-natal, peso ao nascer e maior porcentagem de nascimentos de machos observados durante o experimento foram considerados dentro das expectativas dos relatos de literatura. Apesar destas ocorrências indesejáveis, a técnica de produção in vitro de embriões pode ser aplicada para vacas de alto valor genético que estão impossibilitadas de desenvolver gestação ou não correspondem, no processo de transferência de embriões, como alternativa para reprodução.

# **Produção in vitro de embriões bovinos na Embrapa Gado de Leite**

*Luiz Sérgio de Almeida Camargo*

## **Introdução**

A principal missão da Embrapa Gado de Leite é identificar soluções para o desenvolvimento sustentável do agronegócio do leite no Brasil e nos países tropicais, viabilizando tecnologias que visam ao aumento de sua competitividade. Nesse contexto, o Laboratório de Reprodução Animal encaixa-se estudando biotecnologias para aumentar a eficiência reprodutiva. Entre os temas estudados está a produção in vitro de embriões (PIVE) bovinos, que possui grande potencial de multiplicação de descendentes quando comparada com outras técnicas, como a transferência de embriões (TE) convencional.

O uso da PIVE em programas de melhoramento genético ou núcleos de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOET) contribuirá para o aumento da intensidade de seleção e redução do intervalo entre gerações, permitindo um maior progresso genético e, conseqüentemente, maior número de animais de maior valor produtivo à disposição dos produtores.

Outro aspecto da técnica é permitir maior disseminação do material genético selecionado pelos programas de melhoramento, devido à expectativa de produzir embriões potencialmente mais baratos do que os produzidos pela TE convencional, proporcionando o acesso de pequenos ou médios produtores a animais economicamente produtivos.

Nas pesquisas em PIVE, o Laboratório de reprodução da Embrapa Gado de Leite vem dando maior ênfase em estudos com animais zebuínos com característica

leiteira, como o Guzerá e, principalmente, o Gir. Com isso espera-se estabelecer um protocolo eficiente na produção de embriões e bezerros saudáveis, para que possam ser utilizados nos programas de melhoramento dessas raças e para a produção de F1. Em virtude do pouco conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva, acredita-se que muito pode-se estudar e melhorar com relação a PIV nessas raças.

## Metodologia utilizada na Embrapa Gado de Leite

A maturação dos oócitos é realizada em meios TCM (tissue culture medium) 199, adquiridos comercialmente, e adicionados de 10% de soro inativado de vaca em cio, 20 µg/mL de FSH e antibióticos (penicilina e estreptomicina). Os oócitos são cultivados em volume de 400 mL do meio de cultivo, durante 24 h, ao final do qual são levados para a fecundação in vitro. Na fecundação in vitro temos utilizado o método de "swin up" para a seleção de espermatozóides e a capacitação espermática é feita com heparina na dose variando de 10 a 50 µg/ml quando adicionada no meio de fecundação (Fert Talp). A fecundação é feita em gotas com volume variando de 100 a 160 µl, cobertas com óleo mineral, durante 18 a 22 h, em concentrações espermáticas que variam de 1,8 a 2,6 x 10<sup>6</sup> células/ml. Após a fecundação, os possíveis zigotos são levados para cultivo em meio CR2aa, adicionado de 10% de soro fetal bovino. Alternativamente, adiciona-se 1 mg/L de albumina bovina sérica. Os oócitos são cultivados em co-cultura com suas próprias células do "cumulus" por sete a oito dias, quando então é avaliada a taxa de blastocistos e número de células totais. Em alguns casos, os blastocistos são cultivados até o 10º dia para avaliar a taxa de eclosão. Metade do meio de cultivo é trocado 72 horas após a fertilização quando também é avaliada a taxa de clivagem.

## Resultados obtidos

Uma visão geral dos resultados obtidos no Laboratório da Embrapa Gado de Leite está representada na Tabela 1. Esta tabela mostra as taxas e número de células de embriões cultivados em CR2aa adicionado de SFB ou de BSA, com melhores resultados na presença de SFB, sendo então adotado em todos os cultivos não-experimentais realizados no Laboratório.

**Tabela 1.** Efeito da albumina sérica bovina (BSA) ou soro fetal bovino (SFB) sobre a taxa de clivagem, produção de blastocistos e número de células.

Soro	n	Clivagem n° (%)	Blastocisto n° (%)	N° de células média ± EP (n)
BSA	460	328 (71,3) <sup>a</sup>	64 (13,9) <sup>a</sup>	84,7 ± 3,86 <sup>a</sup> (61)
SFB	480	279 (58,1) <sup>b</sup>	148 (30,8) <sup>b</sup>	104,8 ± 2,63 <sup>b</sup> (132)

A Tabela 2 mostra o resultado e sua variação, quando se utilizou o sêmen de apenas um touro da raça Holandesa, com um pool de oócitos obtidos de doadoras abatidas em matadouro, em várias repetições. Os dados mostram que a repetição de resultados entre as baterias de PIVE é variável, provavelmente por conta de fatores ainda não controlados presentes no meio de cultivo e que não são constantes durante a condução da bateria. Experimentos com sêmen de touros Gir também foram conduzidos na Embrapa Gado de Leite, avaliando principalmente concentração espermática e período de incubação com os oócitos.

**Tabela 2.** Variação na taxa de clivagem e produção de blastocistos oriundos de zigotos fecundados in vitro.

Número total de oócitos	Clivagem (variação)	Blastocistos/total de oócitos (variação)	Blastocistos/zigotos clivados (variação)
390	66,15% (40 – 80%)	30,2% (11,5-50%)	45,7% (15,4 – 69,5%)

A Tabela 3 mostra que o aumento da concentração espermática provoca maior taxa de polispermia, porém o período de incubação estudado não teve efeito, indicando que concentrações de 1 a 2 x 10<sup>6</sup> espermatozóides/ml por 12 ou 18 horas são suficientes para a fecundação in vitro, sem aumentar a taxa de polispermia.

**Tabela 3.** Efeito da concentração espermática e período de incubação sobre a fecundação in vitro com sêmen de touros da raça Gir.

Concentração espermática/ml	Nº	Oócitos fecundados n° (%)	Oócitos com polispermia n° (%)
1 x 10 <sup>6</sup> espermatozóides	121	73 (60,3)	3 (2,5) <sup>a</sup>
2 x 10 <sup>6</sup> espermatozóides	130	81 (62,3)	5 (3,8) <sup>ab</sup>
4 x 10 <sup>6</sup> espermatozóides	106	69 (65,1)	9 (8,5) <sup>b</sup>
Período de incubação			
12 horas	170	102 (60,0)	8 (4,7)
18 horas	187	121 (64,7)	9 (4,8)

<sup>a,b</sup> Valores com diferentes letras sobrescritas na mesma coluna diferem estatisticamente (P<0,05). Fonte: Camargo, L.S.A., Embrapa Gado de Leite.

Nas Figs. 1 e 2 observa-se uma variação na taxa de clivagem e de produção de blastocistos entre touros da raça Gir, utilizados na fecundação in vitro, mostrando a necessidade de uma avaliação prévia do sêmen antes de utilizá-lo em sistema de PIVE, a fim de obter maior taxa de clivagem e conseqüentemente maior produção de embriões. O efeito de doadora também é importante, como observado na Tabela 4, onde a produção variou entre 10 e 32%, provavelmente provocado por diferenças na qualidade dos oócitos.

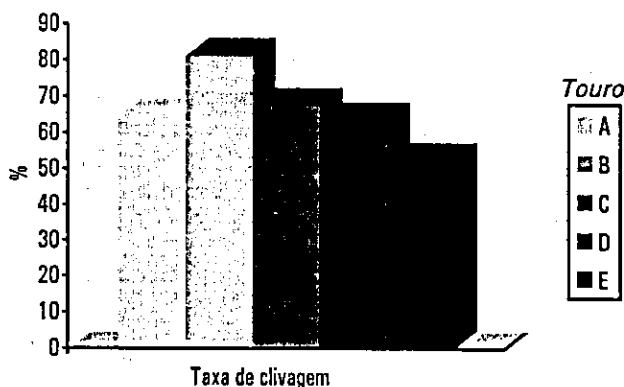


Fig. 1. Taxa de clivagem após a fecundação in vitro com sêmen de diferentes touros da raça Gir (n = 1.257 oócitos).

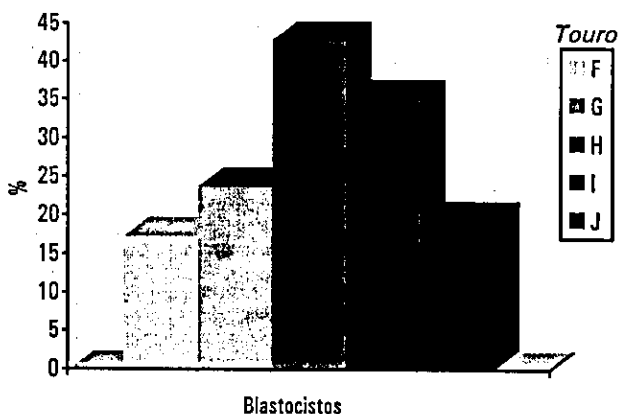


Fig. 2. Taxa de blastocistos após a fecundação in vitro com sêmen de diferentes touros da raça Gir (n = 692 oócitos).

**Tabela 4.** Taxa de clivagem e produção de blastocistos, oriundos de oócitos obtidos por meio de punção folicular realizadas uma ou duas vezes por semana em doadoras da raça Gir.

Doadora	Nº	Clivagem	Blastocistos/total de oócitos	Nº sessões
2564	66	40 (60,6%)	18 (27,3%)	5 (1)
2786	71	54 (76,0%)	20 (28,1%)	4 (1)
5768	62	34 (54,8%)	8 (12,9%)	5 (1)
5752	15	8 (53,3%)	4 (26,6%)	2 (1)
5764	22	8 (36,1%)	3 (13,6%)	2 (1)
5745	144	106 (73,6%)	47 (32,6%)	9 (2)
2803	46	39 (84,8%)	8 (17,4%)	7 (2)
5766	24	16 (66,7%)	6 (25%)	4 (2)
2519	10	5 (50%)	1 (10%)	2 (2)
2441	49	26 (53%)	11 (22,5%)	6 (2)
Variação		36,1 – 84,8%	10 – 32,6%	

## Desafios e perspectivas

A técnica em seu estágio atual já permite a sua utilização a nível comercial, como vem ocorrendo em alguns países da Europa, América do Norte e no Brasil, porém com um ênfase da utilização em animais de alto valor mas com problemas reprodutivos, ou em alguns casos, em programas de melhoramento genético. Talvez um grande fator da falta de estímulo do uso da técnica é o seu preço atual, atingindo valores semelhantes ao de embriões de TE. Uma maneira de reduzir o preço é a produção em escala, diminuindo o efeito dos custos fixos (como equipamentos, depreciação, imóvel) e do investimento inicial sobre o custo final. Outro ponto é a melhora da eficiência da técnica, através da resolução de problemas advindos do cultivo “in vitro”, reduzindo a variabilidade na produção entre touros de média fertilidade, entre doadoras e entre baterias, produzindo embriões de maior viabilidade após transferência, com menores riscos de perda embrionária, abortos ou anormalidades fetais.

Para isso são necessárias pesquisas visando a melhora na qualidade dos oócitos, através de estudos com dinâmica folicular e aplicação de hormônios nas doadoras, principalmente nas raças zebuínas; melhora na taxa de fecundação de touros de média fertilidade; melhora no sistemas de cultivo, afim de se obter um meio quimicamente definido com o mesmo potencial de desenvolvimento embrionário dos meios semi-definidos ou complexos, mas que tenha baixa variabilidade entre as repetições.

Com o uso da biologia molecular torna-se possível estudar mais a fundo os eventos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário, permitindo avaliar se existe alguma alteração na síntese de proteínas ou na expressão gênica provocado pelo uso de hormônios na doadora ou pelo cultivo "in vitro" de oócitos e embriões, bem como verificar a síntese pelos embriões de fatores importantes para o estabelecimento da gestação, como o interferon tau, ajudando, desse modo, a direcionar as pesquisas para um resultado mais rápido e efetivo.

Existe também uma grande perspectiva da utilização da técnica em fêmeas impúberes, o que daria um grande salto para o melhoramento genético, principalmente se associada a marcadores genéticos. A sua aplicação seria ainda maior em animais zebuínos, principalmente a raça Gir e Guzará, cuja puberdade é mais atrasada e seus programas de melhoramento no país são mais recentes. Entretanto, para animais impúberes a técnica ainda enfrenta grandes dificuldades, advinda do baixo potencial de desenvolvimento de seus oócitos, da necessidade da utilização de hormônios e de acesso cirúrgico para os ovários quando em animais extremamente jovens.

## **2º painel: Eficiência, problemas encontrados e perspectivas futuras no uso de embriões bovinos produzidos in vitro**

---

### **Prelecionistas**

André Dayan

João Henrique Moreira Viana

### **Moderador**

José Reinaldo Mendes Ruas



# **Utilização das técnicas de aspiração folicular e fecundação in vitro na reprodução bovina**

*André Dayan*

## **Introdução**

O presente trabalho consiste em uma revisão sobre a recuperação de oócitos bovinos, as diferentes formas de recuperação e as principais utilizações deste material biológico. Porém, será dada maior ênfase na aspiração folicular guiada por ultra-sonografia (OPU - *ovum pick up*) e posterior fecundação in vitro (FIV), uma vez que, juntas, estas técnicas podem ser de grande valia na reprodução animal.

O nascimento do primeiro bezerro produzido por fecundação in vitro ocorreu em 1981 (Bracket et al., 1982) e o primeiro bezerro nascido por OPU-FIV em 1988 (Pieterse et al., 1988). No Brasil, o nascimento do primeiro bezerro produzido in vitro foi em 1993 (Watanabe et al., 1993), enquanto produtos nascidos por OPU-FIV ocorreram em 1996 (Peixer et al., 1996).

## **Fisiologia ovariana**

No terço médio da gestação, o ovário do feto bovino já está repleto de oogônias contidas em folículos primordiais (pré-antrais), e os estágios iniciais do crescimento folicular iniciam-se antes do nascimento (Erickson, 1966 ; Marion et al., 1968).

Ao nascimento existem cerca de 0,5 milhão de folículos nos ovários, os quais, gradualmente, deixam seu estado de dormência e iniciam o desenvolvimento

para folículos antrais. Uma vez iniciado o desenvolvimento, irá ocorrer a ovulação ou a atresia (praticamente todos os folículos sofrem atresia). Isto pode ser demonstrado ao calcularmos que um animal ciclando normalmente num período de 15 anos irá ovular menos de 300 óócitos (ovulando a cada 21 dias ou 17,4 vezes ao ano, multiplicado por 15 = 260 ovulações) dentre o número total de folículos (0,5 milhão) existentes ao nascimento (Erickson, 1966). Isto sem contar o período de gestação dos animais, ou seja, metade da vida reprodutiva.

Fica claro, portanto, que menos de 0,1% dos folículos chegam a ovular. Aparentemente, são necessários 60 dias para que um folículo primordial ativado atinja o tamanho ovulatório (Lussier et al., 1987). Neste período, segundo um padrão de ondas foliculares (Wiltbank et al., 1996), ocorrem várias fases de crescimento e atresia folicular com subsequente maturação ou degeneração oocitária.

Novas biotecnologias visam ao aproveitamento destes folículos para a recuperação dos óócitos e posterior manipulação. A seguir serão descritas algumas delas.

## **Aplicações da técnica**

### **Pesquisas na área da embriologia**

A fecundação in vitro possibilita acompanhar passo a passo o início do desenvolvimento embrionário, permitindo estudar os processos envolvidos na maturação dos óócitos, capacitação do espermatozóide, interação gamética, assim como todas as etapas envolvidas no período da pré-implantação, como a diferenciação celular, expressão gênica etc. Além disso, podemos estudar os processos fisiológicos e patológicos correspondentes, bem como a embriotoxicidade de certas drogas (Kruip et al., 1994).

### **Produção de maior número de embriões**

Uma vez que, pela monta natural ou inseminação artificial (IA), podemos obter apenas um produto por vaca ao ano, novas biotécnicas foram desenvolvidas para acelerar os processos de melhoramento genético. Assim sendo, com o advento da superovulação e posterior transferência de embriões (Moet - *multi*

*ovulation and embryo transfer*), foi possível obter-se em média a produção de 25 embriões ao ano, totalizando cerca de 100 embriões na vida reprodutiva de uma vaca (Saumande et al., 1984).

Kruip et al. (1994) estudaram a eficácia da punção folicular transvaginal orientada por ultra-som em vacas leiteiras e de corte, obtendo uma média de 8,0 óócitos colhidos por sessão, dos quais 16% desenvolveram em embriões transferíveis após MIV/FIV/CIV (maturação, fecundação e cultivo in vitro) com uma taxa de gestação de 40% a 50% (Nibart et al., 1995). Baseado no número médio de óócitos colhidos por sessão, é possível transferir dois embriões/semana/vaca, resultando em um bezerro. Watanabe et al. (1998) obtiveram de um único animal 24 embriões em sete sessões ( $x = 3,5$  embrião/sessão) com uma taxa média de 50% de gestação; assim sendo, é possível obter 1,75 bezerro/semana/vaca.

## Menor intervalo entre gerações

O intervalo entre gerações é um dos elementos-chave em qualquer abordagem sobre melhoramento genético animal (Berreridge, K.J. et al., 1989). O desenvolvimento de folículos antrais em bezerras desde duas semanas de idade (Adams et al., 1994), o conhecimento das ondas foliculares e a habilidade de superestimular o desenvolvimento folicular nesta categoria de animais oferecem a possibilidade de se utilizar animais pré-púberes para a recuperação de óócitos bovinos. Tais óócitos teriam a mesma competência para a FIV quando comparados aos obtidos de animais adultos (Armstrong et al., 1994), porém o número de óócitos recuperados em bezerras tende a ser 20% menor (Nibart et al., 1995).

Brogliatti & Adams (1996), utilizando-se de aspiração guiada por ultra-som, obtiveram êxito na recuperação de óócitos de bezerras a partir de seis semanas de idade. Portanto, os produtos oriundos desta aspiração nascerão quando as doadoras de óócitos tiverem não mais do que um ano de idade.

Assim sendo, o intervalo entre gerações fica obviamente diminuído, permitindo uma avaliação precoce do potencial genético destes animais.

Para exemplificar o ganho genético, podemos avaliar que o método de MOET proporciona um ganho genético para eficiência de crescimento (*Growth-effician*)

em gado de corte entre 1,4 a 2,6%. A utilização da aspiração em novilhas pré-púberes pode elevar este índice para até 22% (Brogliatti & Adams, 1996).

A superovulação (SOV) também pode ser utilizada em novilhas. Brogliatti & Adams, (1996) conseguiram aumentar em até dez vezes o número de óócitos recuperados, bem como o número de folículos visíveis.

## Melhor aproveitamento dos animais

Conforme citado no item anterior, as doadoras de óócitos podem ser utilizadas muito precocemente e, assim sendo, o início de sua vida reprodutiva é muito antecipado. Da mesma forma, estudos realizados com vacas senis (Brogliatti & Adams, 1996) e vacas prenhes (Kruip et al., 1994; Nibart et al., 1995) até o terceiro mês de gestação permitem a produção de embriões pela aspiração guiada por ultra-som. Assim sendo, as vacas podem produzir descendentes, praticamente desde o seu nascimento até depois da perda da ciclicidade fisiológica.

A Tabela 1 mostra a produção de uma vaca de doze anos de idade (Tabela 1).

**Tabela 1.** Produção de embriões in vitro a partir de óócitos oriundos de uma vaca de doze anos de idade que não poderia mais conceber. Oito touros foram utilizados para obter diferentes produtos.

Touros	Óócitos colhidos (x)	Óócitos cultivados	% de embriões
1	12,9	207	9.2
2	15,4	77	9.1
3	14,3	57	3.1
4	10,5	21	19
5	12,5	25	0
6	12,0	12	0
7	16,0	16	0
8	9,0	9	0

Fonte: Kruip et al. (1994).

## Produtos obtidos de vacas que não respondem à superovulação

Uma vez que a OPU-FIV não requer tratamento hormonal para o seu sucesso, pode-se aproveitar de forma muito eficiente animais que não respondem à superovulação, seja por anomalias adquiridas (resistência ao hormônio) ou por serem refratárias à SOV. Assim sendo, vacas que possuem grande potencial

genético podem ser doadoras de oócitos, não importando mais sua resposta à SOV (Kruip et al., 1994).

## Produtos obtidos de animais com problemas reprodutivos

Muitos são os casos de animais inférteis ou subférteis por problemas adquiridos. São freqüentes os casos de aderências de ovário e útero, metrites crônicas, infecções tubéricas (Looney et al., 1994), e outras patologias. A OPU-FIV permite a produção de progênie de animais com tais enfermidades (Kruip et al., 1994), uma vez que ela não necessita do restante do aparelho reprodutivo, bastando o ovário possuir folículos de tamanho suficiente para a aspiração. Os resultados obtidos de animais com tais patologias não diferiu dos resultados obtidos de animais saudáveis (Kruip et al., 1994).

## Utilização de animais mortos

São freqüentes os casos de proprietários que desejam obter mais crias de uma vaca acidentada, enferma ou morta. A remoção dos ovários destes animais pode resultar na recuperação de oócitos viáveis e posterior produção de progênie. Assim sendo, um animal recém-morto ou *ante-mortem* ainda pode produzir um descendente. Watanabe et al., (1998<sup>b</sup>), utilizando-se de animais descartados de uma central, obtiveram uma produção conforme a Tabela 2.

**Tabela 2.** Número de oócitos aspirados e blastocistos produzidos por fêmeas em diferentes idades.

Vacas	Idade (anos)	Nº de oócitos	Nº de oócitos	Nº de blastocistos
		Total	viáveis	(%)
1	13	15	11	3 (27)
2	13	7	2	1 (50)
3	17	6	1	1 (100)
4	10	27	7	5 (71)
5	15	11	5	3 (60)
6	14	82	35	6 (17)
7	15	3	2	2 (100)
8	14	8	4	2 (50)
9	19	20	11	4 (36)
10	14	0	0	0
11	11	15	4	3 (75)
Total		194	82	30 (37)

## Pré-seleção de touros

A aplicação a campo dos avanços das biotécnicas da reprodução genética animal pode e deve ser utilizada como uma ferramenta de seleção de touros e matrizes.

A fertilidade de touros está relacionada com a probabilidade de sucesso do espermatozoide em fecundar o oócito, formar o zigoto, seguir o desenvolvimento embrionário e fetal até o nascimento. Evidentemente, esta fertilidade in vivo apresenta uma variação entre os touros, a qual in vitro se apresenta de forma semelhante (Fig. 1) (Watanabe et al., 1998).

Um método adequado de verificar a fertilidade de touros pode ser efetuado mediante a fecundação in vitro, em que se detectam espermatozoides de touros com baixa fertilidade. Resultados observados, na fertilidade in vitro entre touros, consideram a habilidade do espermatozoide em fecundar o oócito e o zigoto continuar o desenvolvimento in vitro até o estágio de blastocisto (Gordon, 1991; Lacalandra et al., 1992; Watanabe & Oliveira Filho, 1994; Watanabe et al., 1995). Em 1992, Marquant-Le Guenne et al. observaram uma alta correlação entre as taxas de blastocisto e fertilidade a campo de touros distintos ( $r = 0,84$ ).

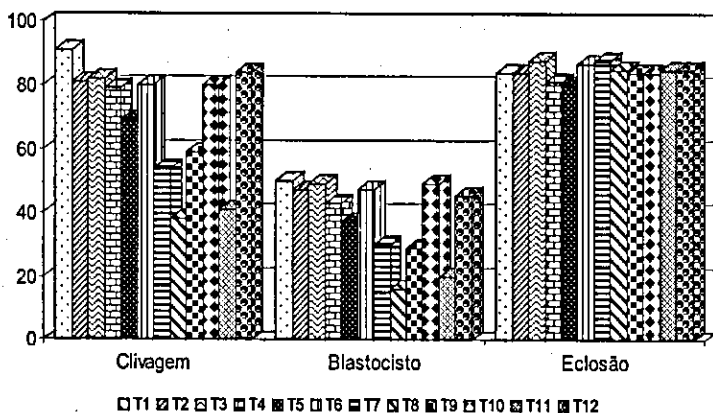


Fig. 1. Variação na produção in vitro a partir de sêmen de diferentes touros.

## Vantagens de aplicação da técnica

Não ocorrem efeitos deletérios significativos aos animais, mesmo após cinco meses de punções, duas vezes por semana, no que concerne aos exames de

saúde e fertilidade, clínicos ou *post mortem*. No exame histológico, animais que foram aspirados por vários meses apresentaram maior quantidade de colágeno na túnica albugínea (Kruip et al. 1994).

Stubbings & Walton (1995) demonstraram que em gado de leite aspirações mensais de todos os folículos iguais ou maiores do que 5 mm alteram o ciclo, promovendo apenas um aumento de quatro dias entre estros.

Portanto, a produção in vitro de embriões de alto mérito genético pode tornar-se uma alternativa à técnica Moet, por não utilizar hormônios, evitando assim os efeitos nocivos à fertilidade do animal, e ainda aumentar o número de embriões por doadora (Gibbons et al., 1994; Kruip et al., 1994).

## **Desvantagens de aplicação da técnica**

Além das grandes variações dos resultados apresentados pelos diversos autores e de não haver um padrão de meios de coleta e das respostas à superestimulação, a técnica ainda é muito onerosa. Bols et al. (1995) descrevem que as agulhas são um dos equipamentos descartáveis mais caros do processo de aspiração. Elas são de difícil esterilização e após algumas sessões elas ficam rombudas e afiá-las não produz o mesmo efeito das novas. Este grupo tentou com certo êxito o uso de agulhas descartáveis, porém novos estudos devem ser feitos para aumentar as taxas de recuperação.

Foram encontradas massas ecogênicas no interior de 25 dos 37 folículos aspirados por Brogliatti et al. (1995). Estas massas ecogênicas, primeiramente sugeridas como células da granulosa luteinizadas, foram consideradas hematomas provocados pela aspiração, uma vez que não foi detectado aumento na progesterona sérica.

## **Variações na recuperação**

A aspiração folicular, por ser uma técnica bastante recente, apresenta resultados muito variáveis quanto ao número de folículos aspirados, ao número de oócitos recuperados e à taxa de blastocistos produzidos. A seguir serão expostas algumas causas das variações nos resultados de diferentes autores.

## Diferenças entre animais

A variabilidade entre doadoras de oócitos é muito grande, e os animais respondem diferentemente à aspiração folicular (Nibart et al., 1995). Porém, o número de oócitos recuperados de um mesmo animal não varia entre as coletas. Segundo Kruip et al. (1994), existe um recrutamento constante de novos folículos quando os presentes são aspirados e a taxa de recrutamento tem uma variação individual.

A Tabela 3 (Kruip et al., 1994) demonstra a grande variabilidade entre vacas.

**Tabela 3.** Variação individual entre vacas quanto ao número médio de oócitos coletados e produção de embriões in vitro, após 22 sessões de aspiração folicular.

Vacas	Folículos aspirados (x)	Oócitos colhidos (x)	Nº de oócitos cultivados	Embriões (%)
1	15,5	11	165	26,1
2	19,0	11	182	23,1
3	19,1	10	182	17,0
4	18,0	10	171	15,8
5	13,2	10	156	6,4
6	17,4	9	139	9,4
7	9,8	8	126	17,5
8	10,7	5	89	15,7
9	8,1	5	78	9,0
10	14,1	4	78	11,5
Total	14,5	8	1.366	16

Fonte: Kruip et al. (1994).

## Variações entre operadores

O operador pode determinar grandes variações no número de folículos aspirados, bem como no número de oócitos recuperados. Esta variação ocorre entre operadores, da mesma forma como entre sessões com o mesmo operador (Nibart et al., 1995). Lansbergen et al. (1995) descrevem que houve variações significativas entre veterinários na taxa de recuperação. Sua equipe era formada por cinco veterinários operando em duas estações experimentais. Com sucessivas trocas de equipes, foi comprovada que a maior variação ocorre devido à doadora e o segundo fator mais importante é o operador.

## **Variações do comportamento do animal**

Animais nervosos que se debatem no tronco, principalmente jovens, podem dificultar a aspiração, reduzindo assim o resultado de uma ou mais sessões (Hill, 1989).

## **Tipo de animal**

O número médio de oócitos coletados é pouco diferente entre as doadoras do tipo leiteiro ou de corte. Entretanto, Looney et al. (1994) acharam resultados um pouco superiores em vacas de corte.

## **Variações com o tipo de equipamento utilizado**

Nibart et al. (1995) apresentam uma revisão que demonstra que, globalmente, qualquer que seja o sistema de visualização e de punção, os resultados em termos de oócitos coletados é o mesmo.

Hill et al. (1995) realizaram aspiração folicular sem o auxílio de ultra-som, utilizando-se apenas da palpação retal, e obtiveram média de 6,2 oócitos recuperados por doadora.

Brogliatti & Adams (1996) destacaram a importância de aspectos como espessura da agulha, fio de corte do bisel, forma do bisel e pressão de vácuo, que podem alterar a eficiência de recuperação. Relatam também que em eqüinos as agulhas de duplo-lúmen (*flushing*) tendem a aumentar a taxa de recuperação de oócitos. O aumento da pressão de aspiração em humanos demonstrou maior taxa de recuperação, porém uma diminuição na qualidade dos oócitos, além de aumentar o número de oócitos desnudos (Ushijima et. al., 1993 citação). A presença de células do *cumulus* é importante para aumentar a taxa de desenvolvimento de oócitos maturados e fecundados in vitro (Konishi et al., 1996b).

Os efeitos mecânicos da manipulação estão sendo muito estudados (Brogliatti & Adams, 1996).

Bols et al. 1995 obtiveram maiores taxas de recuperação por folículos aspirados usando agulhas mais espessas (18 G), independentemente da pressão do vácuo. Houve maior número de oócitos recuperados com o aumento da pressão de

vácuo, porém diminuiu a quantidade de células do *cumulus*, independentemente do calibre da agulha. Agulhas mais finas apresentaram melhor COC (complexo *cumulus*-oócitário) com células do *cumulus* mais compactas.

## Frequência da aspiração

A taxa de recuperação de oócitos imaturos aumenta, se forem realizadas repetidas coletas no mesmo animal (Kruip et al., 1994). A aspiração repetida duas vezes por semana produz um aumento considerável no número de folículos visíveis (16,2 *versus* 7,0) e de oócitos recuperados (12,2 *versus* 5,2) (Reichembach et al., 1994).

Gibbons et al. (1994) também obtiveram maior número de embriões transferíveis em aspirações realizadas duas vezes por semana.

Hasler et al. (1995) demonstraram que o número de oócitos produzidos caiu consideravelmente após 50 sessões de aspiração em um mesmo animal.

## Consideração final

A aspiração folicular e fecundação in vitro vem apresentando-se como uma forma alternativa para a produção de embriões a partir de oócitos oriundos de vacas com diversas características reprodutivas. É uma técnica recente, e que deve apresentar uma acentuada evolução nos próximos anos, apresentando-se como uma alternativa eficiente na produção de embriões de alto valor genético. É importante ressaltar que esta técnica não veio para substituir outras técnicas (como a Transferência de Embriões), mas sim, junto a elas, melhorar a eficiência reprodutiva destes animais, e acima de tudo atuar no melhoramento genético do rebanho bovino.

## Referências bibliográficas

ADAMS, G. P.; EVANS, A. C. O.; RAWLINGS, N. C. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. *J. Reprod. Fertil.* v. 100 p. 27-33, 1994.

- ARMSTRONG, D. T.; IRVINE, B.; EARL, C. R.; McLEAN, D.; SEAMARK, R. F. Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes. *Theriogenology*, v. 42 p. 1227-1236, 1994.
- BERRERIDGE, K. J.; SMITH, C.; STUBBINGS R. B.; XY, K. P.; KING, W. A. Potencial genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. *J. Reprod. Fertil.* v. 38. p. 87-98, 1989.
- BOLS, P. E. J.; VANDENHEEDE, J. M. M.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: New disposable needle guidance system. *Theriogenology*, v. 43, p. 677, 1995.
- Brackett, B. G.; Bousquet, D.; Boice, M. L.; Donarvick, W. J.; Evans, J. F.; Dressel, M. A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, vol. 27, p. 147-158, 1982.
- BROGLIATTI, G. M.; ADAMS, G.P. Ultrasound guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology*, v. 45, p. 1163, 1996.
- BROGLIATTI, G. M.; FUENTE, J.; BERGFELT, B. R.; ADAMS, G. P. Ovarian dynamics subsequent to ultrasound guided follicle ablation in prepubertal calves. In 11ª Réunion A.E.T.E., *Proceedings*, Hannover, 1995.
- Erickson, B. H. Development and senescence of postnatal bovine ovary. *J. Anim. Sci.* v. 25, p. 800, 1966.
- GIBBONS, J. R.; BEAL, W. E.; KRISHER, R. L.; FABER, E. G.; PEARSON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Effects of once versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology* v. 42, p. 405. 1994.
- GORDON, I. Potential application of cattle *in vitro* fertilization in commercial practice and research. *Embryo Transfer Newsletter*, vol. 9, p. 4-17, 1991.
- HILL, K. G. Experiences with bovine follicular aspiration. *Proceedings of the VIII annual convention AETA*, p. 69. 1989.
- HILL, B. R. A simple method of transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology*, v. 41 p. 235, 1995.
- KONISHI, M.; AOYAGI, Y.; TAKEDOMI, T. et al. Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved in vitro development of IVM-IVF bovine

oocytes that were collected by ultrasound-guided transvaginal aspiration. *Theriogenology*, v. 45 p. 573, 1996b.

KRUIP TH, A. M.; BONI, R.; WURTH, Y. A.; ROELOFSEN, M. W. M.; PIETERSE, M. C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, v. 42, p. 675-684, 1994.

LACALANDRA, G. M.; DELL'SQUILA, M. E.; FUSCO, S.; SCIORCI, R. L.; PERONE, P.; MINOIA, P. *In vitro* fertility test of bull semen. In: International Congress on Animal Reproduction, XII, 1992, Hague, *Proceedings*, p. 656-658.

LANSBERGEN, L. M. T. E.; VAN W. LEEUW A. M.; DAAS, J. H. G.; RUIG, L.; VAN DER STREEK, G.; REINDERS, J. M. C.; AARTS, M.; RODEWIJK, J. Factors affecting ovum pick-up in cattle., *Theriogenology*, v. 43 p. 259, 1995.

LOONEY, C. R.; LINDSEY, B. R.; GONSETH, C. L.; JOHNSON, D. L. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology* v. 41. p. 73. 1994.

LUSSIER, J. G.; MATTON, P.; DUFOUR, J. J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J. Reprod. Fertil.* v. 81. p. 301, 1987.

MARION, G. B.; GIER, H. T.; CHOUDARY, J. B. Micromorphology of the bovine ovarian follicular system. *J. Anim. Sci.* v. 27, p. 451, 1968.

MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P.; GUILLON, N.; GERARD, O.; THIBIER, M. *In vitro* fertilization as a tool to evaluate fertility in the bovine. In: International Congress on Animal Reproduction, XII, 1992, Hague, *Proceedings*, vol. 2, p. 662-664.

NIBART, M.; SILVA PEIXER, M.; THUARD, J. M.; DURANT, M.; GUYADER-JOLY, C.; PONCHON, S.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Embryo production by OPU and IVF in dairy cattle. In: 11ª Réunion A.E.T.E., XI, Hannover, *Proceedings*, p. 216., 1995.

PIETERSE M. C.; KAPPEN, K. A.; KRUIP, A.; M.TAVERNE, M. A. M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning ovaries. *Theriogenology*, vol. 30, p. 751-756, 1988.

REICHENBACH, H. D.; WIEBKE, N. H.; MÖDL, J.; ZHU, J.; BREM, G.

Laparoscopy through the vaginal fornix of cows for the repeated aspiration of follicular oocytes. *J. Rep. Fertil.*, v. 101, p. 547, 1994.

SAUMANDE, J.; PROCUREUR, R.; CHUPIN, D. Effect of injection time and anti-PMSG antiserum on ovulation rete and quality of embryos in superovulated cow. *Theriogenology* v. 21 p. 727, 1984.

STUBBINGS, R. B.; WALTON, J. S. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrus cycle and follicular dynamics in holstein cows. *Theriogenology*, v. 43 p. 705, 1995.

Watanabe, Y. F. Desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos após maturação e fecundação *in vitro* com sêmen de *Bos taurus* e *Bos indicus*. Jaboticabal, 1993. 131 p. Dissertação (Mestrado). FCAVJ-UNESP.

WATANABE, Y. F.; OLIVEIRA FILHO, E.B. Efeito de touros na produção *in vitro* de embriões bovinos. *Zootecnia, Nova Odessa*, vol. 32, p. 35, 1994.

WATANABE, Y. F.; WATANABE, M. R.; PERIPATO, A. C.; GALERANI, M. A. V.; VILA, R. A.; LÔBO, R. B. A fecundação *in vitro* como critério de seleção para fertilidade em tourinhos da raça Nelore. *Rev. Bras. Gen.*, vol. 18, p. 236, 1995.

WATANABE, Y. F. A fecundação *in vitro* e a reação acrossomal como critério de seleção para fertilidade touros nelore. Ribeirão Preto/SP, 1998. 93p. Tese (Doutorado), FMRP-USP.

WATANABE, M. R.; DAYAN, A.; FRANCESCHINI, P. H.; VILA, R. A.; GALERANI, M. A. V.; LOBO, R. B.; WATANABE, Y. F. Produção *in vitro* de embriões por sessão de aspiração em fêmeas Nelore. XII Reunião da Soc. Bras. de Transf. de Embriões. 1998 – Poster.

WILTBANK, M. C.; PURSLEY, J. R.; FRICKE, P. M.; VASCONCELOS, J.; GUENTHER, J. N.; GIBBONS, J. R.; GINTHER, O. J. Development of AI and ET programs that do not require detection of estrus using recent information on follicular growth. *Proceedings of the XV Annual Convention AETA*. p.23, 1996.



# Punção folicular em bovinos da raça Gir: resultados, perspectivas e desafios<sup>1</sup>

*João Henrique Moreira Viana*

## Introdução

O desenvolvimento da técnica de punção folicular orientada por ultra-som, e sua posterior adaptação para o uso em medicina veterinária, criaram uma nova perspectiva para a produção in vitro de embriões bovinos. Esta técnica possibilitou a recuperação in vivo de oócitos, repetidas vezes e com um mínimo de trauma para os animais utilizados como doadoras, resultados não-possíveis com a utilização de oócitos provenientes de ovários obtidos em matadouro, ou com a abordagem cirúrgica dos ovários. Também possibilitou a utilização de animais em diferentes períodos do ciclo estral, pré-púberes ou em gestação inicial, assim como o uso de animais com problemas de fertilidade decorrentes de patologias na porção tubular do trato genital. Estas vantagens tornaram a punção folicular a técnica de eleição para a recuperação de oócitos destinados à produção in vitro de embriões, quando objetiva-se a multiplicação de doadoras de alto valor genético.

A eficiência do uso da punção folicular como fonte de oócitos para a maturação, fertilização e cultivo in vitro, contudo, depende do número e qualidade dos oócitos recuperados. Diversos avanços foram obtidos no controle dos fatores

---

<sup>1</sup> Trabalho financiado pela Fapemig e pelo CNPq.

mecânicos que limitavam a eficiência da técnica, como estabelecimento das configurações ideais do sistema de punção, da pressão de vácuo e da resolução do equipamento de ultra-sonografia utilizados. Os fatores biológicos que interferem nos resultados da associação entre punção folicular e produção in vitro de embriões, contudo, são menos conhecidos, particularmente nas raças zebuínas, largamente utilizadas na pecuária nacional para a produção de carne e leite. A dinâmica do crescimento folicular nos bovinos determina flutuações periódicas no número e "status" funcional dos folículos disponíveis para a punção, e pode ser uma importante fonte de variação nos resultados da técnica. Objetivando-se superar esta deficiência, foram iniciadas pesquisas na Embrapa Gado de Leite sobre o uso da punção folicular em vacas da raça Gir, avaliando-se o efeito de diferentes protocolos de coleta com ou sem estimulação exógena sobre a fisiologia ovariana, o perfil endócrino e a recuperação de complexos *cumulus*-oócitos viáveis.

## Metodologia

A configuração básica do sistema de punção foi a mesma nos diferentes experimentos realizados. As punções foram realizadas por meio de um aparelho de ultra-sonografia (Scanner 100S, Pie-Medical) equipado com um transdutor setorial intravaginal de 7,5 MHz e uma guia para punção folicular. Foram utilizadas agulhas descartáveis de 50 mm, nos calibres 19 e 20 Gauge (Neolus, Terumo Co.), renovadas para cada novo animal a ser coletado ou caso fosse constatada uma perda significativa no fio delas. Na conexão entre a agulha e o recipiente final foram utilizados circuitos de silicone com diâmetros internos e externos de 1,35 e 2,3 mm (ou 4 e 7 Gauge), respectivamente, e com 80 cm de comprimento. Optou-se por uma pressão de vácuo de 80 mmHg, que correspondia no sistema utilizado a um fluxo de 6 a 8 ml por minuto. Os folículos com diâmetro superior a 3 mm visualizados foram identificados e mensurados antes da punção. O circuito de punção era periodicamente perfundido com uma solução de heparina (125 U.I./ml) para evitar a formação de coágulos. O aspirado folicular foi recuperado em filtros com malha de 80  $\mu$  contendo PBS acrescido de albumina sérica ou soro fetal bovino. Os oócitos identificados foram avaliados e classificados quanto ao número de camadas de células do *cumulus* e ao aspecto do citoplasma, e conduzidos em meio Talp-Hepes ao Laboratório de Fertilização in vitro, localizado em Juiz de Fora, a uma distância aproximada de 40 km.

## Resultados parciais

### Efeito da frequência de punção

A eliminação da população de folículos com mais de 3 mm presente nos ovários, decorrente da realização de punções foliculares, resulta no surgimento de uma nova onda de crescimento folicular. Em animais que são submetidos periodicamente à aspiração folicular, o intervalo entre as punções pode determinar o estágio de desenvolvimento da nova onda de crescimento e o estabelecimento ou não de um novo folículo dominante. Objetivando-se determinar o melhor protocolo para a utilização da técnica de OPU na raça Gir, avaliou-se o efeito de diferentes regimes de punção (intervalos de 3, 4 e 7 dias) sobre o número, qualidade e capacidade de desenvolvimento in vitro dos oócitos recuperados. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 1. Não houve diferença no número de folículos presentes ou puncionados em função do regime de punção adotado. Entretanto, punções mais frequentes proporcionaram a recuperação de um maior percentual de oócitos de melhor qualidade, o que se refletiu posteriormente no cultivo in vitro, resultando em maiores taxas de produção de embriões em vacas puncionadas duas vezes por semana. Regimes de punção mais intensos, além de mais eficientes do ponto de vista biológico, apresentaram a vantagem de demandarem um menor período de manutenção da doadora para a obtenção do mesmo número de embriões.

**Tabela 1.** Resultados obtidos na recuperação de oócitos por punção folicular e produção in vitro de embriões em função do regime de punção.

Resposta avaliada	1 x semana	2 x semana
Folículos puncionados por sessão (média $\pm$ E.P.)	12,05 $\pm$ 0,58 a	11,62 $\pm$ 0,62 a
Oócitos recuperados por sessão (média $\pm$ E.P.)	8,95 $\pm$ 0,76 a	7,00 $\pm$ 0,74 b
Taxa de recuperação	74,31 a	58,74 b
Oócitos selecionados para cultivo (%)	83,77 a	96,78 a
Oócitos classificados como grau I (%)	8,86 a	16,97 b
Taxa de clivagem (%)	68,59 a	68,62 a
Taxa de embriões com mais de quatro células (%)	39,94 a	49,51 b
Taxa de formação de blastocistos (%)	21,63 a	31,76 b
Produção de embriões por sessão	1,82	2,05
Produção de embriões por semana	1,82	4,10

A avaliação da dinâmica folicular no intervalo entre punções mostrou que nova onda de crescimento é estabelecida 12 horas após a punção folicular. A população folicular presente aumenta até 48 horas, não ocorrendo qualquer aumento significativo a partir de então (Fig. 1).

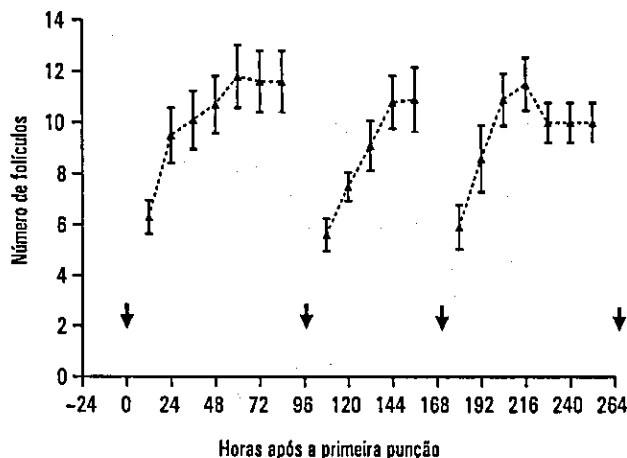


Fig. 1. População folicular total no intervalo entre punções (setas).

O novo folículo dominante, contudo, continua a crescer até 84 horas após a punção, e os dois maiores folículos subordinados até 60 a 72 horas (Fig. 2). O número de folículos presentes, portanto, não é um fator limitante para a utilização de intervalos tão curtos quanto dois dias entre punções. O menor diâmetro dos folículos presentes até 72 horas após a punção, entretanto, pode comprometer as taxas de recuperação oocitárias em intervalos de punção inferiores a três a quatro dias.

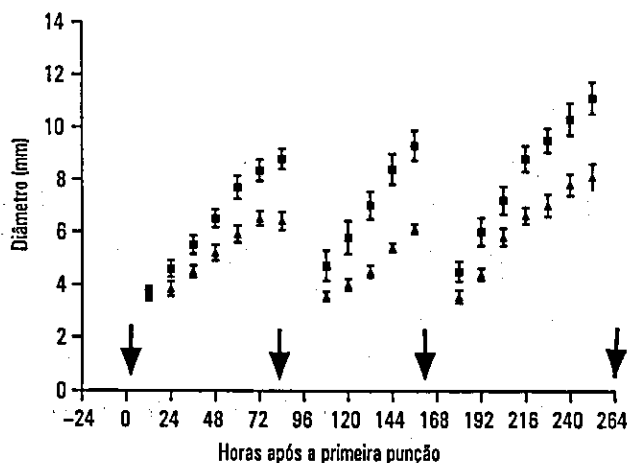


Fig. 2. Diâmetro médio do folículo dominante e do segundo maior folículo no intervalo entre punções (seta).

## Efeito do uso de progestágenos

Intervalos entre punções de sete dias ou superiores possibilitam que o folículo dominante que emerge após uma sessão de punção possa atingir os estádios finais de maturação e, eventualmente, ovular. Esta hipótese foi corroborada pela observação de que a concentração média de progesterona no grupo puncionado 1 x semana foi superior à do grupo puncionado 2 x semana ( $P < 0,05$ ).

Objetivado-se controlar a presença de concentrações elevadas de progesterona como fonte de variação nos resultados, avaliou-se o efeito do uso ou não de implantes auriculares de norgestomed sobre grupos de vacas submetidas ao mesmo protocolo de punção folicular.

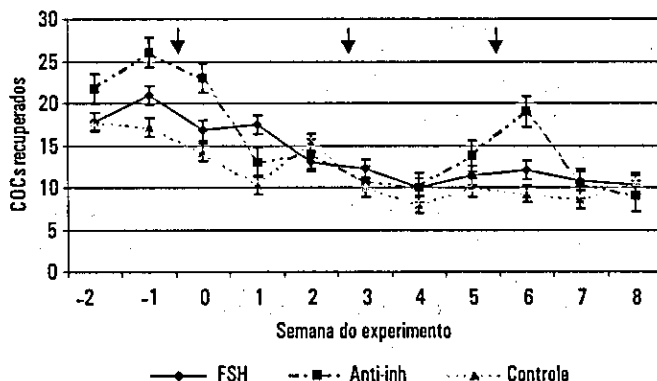
A administração de progestágenos exógenos reduziu ( $P < 0,05$ ) o número de folículos com diâmetro superior a 9 mm e a concentração de estradiol no momento da punção, mas não afetou ( $P > 0,05$ ) a população folicular total, o número de folículos puncionados, o número de estruturas recuperadas, o percentual de oócitos de melhor qualidade ou o percentual de oócitos classificados como viáveis. Estes resultados demonstram que a manutenção de concentrações elevadas de progestágenos não compromete os resultados da técnica de OPU. Por outro lado, a presença de corpos lúteos pode interferir na eficiência da punção folicular, dificultando o acesso aos folículos e aumentando a presença de sangue no aspirado folicular. A utilização de progestágenos exógenos mostrou-se uma alternativa viável quando se deseja evitar a ocorrência de ovulações e formação de corpos lúteos em vacas em regime de punção folicular.

## Efeito da estimulação exógena

Diversos protocolos de estimulação hormonais têm sido utilizados objetivando-se aumentar o número e/ou qualidade dos oócitos recuperados pela punção folicular. Os resultados, entretanto, têm sido freqüentemente inconstantes. Foram avaliados dois destes protocolos, a pré-estimulação com FSH e a imunização ativa contra inibina suína. Apesar do efeito dos tratamentos sobre o diâmetro médio e sobre a taxa de crescimento folicular, não houve aumento no número ou qualidade dos oócitos recuperados em relação ao grupo controle (Fig. 3). Este fato pode ter sido decorrente da grande variação individual na resposta à pré-estimulação, que ocorreu apesar da homogeneidade do grupo experimental.

O tratamento com FSH (ou a imunização contra inibina) não aumenta a população folicular total, mas aumenta o estágio de desenvolvimento dos folículos presentes, o que poderia facilitar o procedimento de punção. Contudo, folículos

de maior tamanho podem colabar e encarcerar o COC antes de sua efetiva aspiração, além de dificultar o manuseio do ovário. Os resultados da pré-estimulação sobre a produção de oócitos por OPU foram, de forma geral, inconclusivos, e novos estudos serão necessários para o estabelecimento do real benefício e do protocolo ideal de utilização.



**Fig. 3.** Recuperação de oócitos (médias e E.P.M.) em vacas Gir submetidas a diferentes pré-tratamentos estimulatórios. O momento da aplicação do imunógeno está demonstrado pelas setas (↓).

## Lesões subseqüentes ao procedimento

Os animais submetidos a punções foliculares foram periodicamente avaliados para o monitoramento da ocorrência e intensidade de lesões subseqüentes ao procedimento. Os resultados demonstram que as perfurações do fundo de saco vaginal são prontamente cicatrizadas, e em apenas duas ocasiões foram observadas irritações transitórias da vagina e cérvix. As perfurações dos ovários, contudo, foram associadas ao aparecimento de seqüelas como aderência e fibrose, particularmente em vacas submetidas a mais de dez sessões de punção. A incidência e intensidade das lesões, após dez a vinte sessões, foi determinada pelo número de folículos puncionados por sessão. Entretanto, não se observou redução na recuperação de oócitos por vaca ao longo do período experimental, mesmo quando foram constatadas seqüelas ao tratamento.

Desta forma, a ocorrência de lesões ovarianas só seria um fator importante em animais com uma perspectiva de uso muito intensivo da técnica de punção folicular.

## **Perspectivas e desafios**

Os resultados obtidos até o presente momento demonstram o potencial da técnica na produção de embriões, particularmente em regimes de coleta mais intensivos, possibilitando a obtenção de um número de produtos de uma determinada doadora muito superior àquele obtido por outros procedimentos de manipulação da função reprodutiva, e em um menor espaço de tempo. Entretanto, a otimização da produção in vitro de embriões a partir de oócitos recuperados por punção folicular requer um contínuo aperfeiçoamento da técnica, e a transposição de algumas limitações biológicas. Dentre estas, ressaltamos:

### **Variação na produção de oócitos**

A produção individual de oócitos apresenta uma relativa constância, independentemente do esquema de recuperação utilizado. Observa-se, contudo, uma grande variação entre doadoras, não-associada à raça, condição corporal, manejo ou qualquer outra causa aparente, e esta tem sido a principal fonte de variação nos resultados da punção folicular. Em uma mesma sessão de punção (14/09/00), em um grupo de 14 vacas, a produção individual variou de 02 a 67 estruturas recuperadas por doadora. Esta variância resulta de diferenças no recrutamento folicular, e que determinam a disponibilidade de folículos para punção. O controle desta fonte de variação requer o estabelecimento de sua origem e dos mecanismos genéticos, endócrinos e intra-ovarianos envolvidos.

### **Variação nas respostas à estimulação hormonal**

A população total de folículos em crescimento é uma das principais fontes de variação da resposta à superovulação. Entretanto, a observação de diferenças na sensibilidade à estimulação exógena, mesmo entre grupos de folículos no mesmo estágio de desenvolvimento, demonstram a necessidade de um melhor entendimento dos mecanismos intra-ovarianos de controle do crescimento folicular. Estas diferenças têm implicações diretas nos resultados de qualquer protocolo de estimulação hormonal, tanto para a produção in vitro como in vivo de embriões.

### **Resposta ovariana às punções**

Ainda que o procedimento de punção folicular seja considerado pouco agressivo, e as seqüelas subseqüentes moderadas, é necessário o estabelecimento do real

efeito deste procedimento sobre os ovários, particularmente considerando-se a possibilidade do uso de animais em início de vida reprodutiva, ou em regimes intensivos de punção. O padrão de regressão dos folículos punccionados ainda não está estabelecido, assim como o eventual efeito das punções sobre a população de folículos em fase pré-antral.

Outro problema observado foi a progressiva dificuldade na realização da anestesia epidural em animais punccionados sucessivamente e em menores intervalos de tempo. Dificuldade semelhante tem sido relatada na literatura, e demanda soluções alternativas para a dessensibilização do trato genital.

## Referências

- ARMSTRONG, D.T.; IRVINE, B.J.; EARL, C.R.; McLEAN, D.; SEAMARK, R.F. Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro production from calf oocytes. *Theriogenology*, v.42, p.1227-1236, 1994.
- BECKER, F.; KANITZ, W.; NÜRNBERG, G.; KURTH, J.; SPITSCHAK, M. Comparison of repeated transvaginal ovum pick up in heifers by ultrasonographic and endoscopic instruments. *Theriogenology*, v.46, p.999-1007, 1996.
- BOLS, P.E.J.; VANDENHEEDE, J.M.M.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. Transvaginal ovum pick-up in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology*, v.43, p.677-687, 1995.
- BOLS, P.E.J.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; VANDENHEEDE, J.M.M.; DE KRUIF, A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.45, p.1001-1014, 1996.
- BONI, R.; ROELOFSEN, M.W.M.; PIETERSE, M.C.; KOGUT, J.; KRUIP, T.A.M. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology*, v.48, p.277-289, 1997.
- BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CARBONEAU, G.; DUROCHER, J. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology*, v.51, p.59-70, 1999.

BUNGARTZ, L.; LUCAS-HAHN, A.; RATH, D.; NIEMAN, H. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology*, v.43, p.667-676, 1995.

FRY, R.C.; NIAL, E.M.; SIMPSON, T.L.; SQUIRES, T.J.; REYNOLDS, J. The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology*, v.48, p.977-987, 1997.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, v.55, p.1341-1357, 2001.

GARCIA, A.; SALAHEDDINE, M. Effect of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology*, v.50, p.575-585, 1998.

GIBBONS, J.R.; BEAL, W.E.; KRISHER, R.L.; FABER, E.G.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Effect of once versus twice - weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*, v.42, p.405-419, 1994.

GOODHAND, K.L.; WATT, R.G.; STAINES, M.E.; HUTCHINSON, J.S.M.; BROADBENT, P.J. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology*, v.51, p.951-961, 1999.

HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, P.J.; JIN, Z.Q.; McCAULY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; TRIMMER, S.A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, v.43, p.141-152, 1995.

KONISHI, M.; AOYAGI, Y.; TAKEDOMI, T.; ITAKURA, H.; ITOH, T.; YAZAWA, S. Production and transfer of IVF embryos from individual inhibin-immunized cows by ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v.58, n.9, p.893-896, 1996.

KRUIP, Th.A.M.; BONI, R.; WURTH, Y.A.; ROELOFSEN, M.W.M.; PIETERSE, M.C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, v.42, p.675-684, 1994.

LARSSON, B. In vitro fertilization using different sources of oocytes. *Acta Agric. Scandinavica*, suppl. 29, p.30-36, 1998.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Molecular Reproduction Development*, v.37, p.48-53, 1994.

LOONEY, C.R.; LINDSEY, B.R.; GONSETH, C.L.; JOHNSON, D.L. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, v.41, p.67-72, 1994.

MACHATKOVÁ, M.; JOKESOVÁ, E.; PETELIKOVÁ, J.; DVORÁČEK, V. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology*, v.45, p.801-810, 1996.

PIETERSE, M.C.; KAPPEN, K.A.; KRUIP, T.A.M.; TAVERNE, M.A.M.. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, v.30, p.751-762, 1988.

RAJAMAHENDRAN, O.M.; BOEDIONO, R.; SUZUKI, T. Ultrasound-guided follicle aspiration and IVF in dairy cows treated with FSH after removal of the dominant follicle at different stages of the estrous cycle. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v.59, n.5, p.371-376, 1997.

SCHERNTHANER, W.; WENIGERKIND, H.; STOJKOVIC, M.; PALMA, G.A.; MODL, J.; WOLF, E.; BREM, G. Pregnancy rate after ultrasound-guided follicle aspiration in nonlactating cows from different breeds. *Journal of the Veterinary Medical Association*, v.46, p.33-37, 1999.

SIRARD, M.A.; PICARD, L.; DERY, M.; COENEN, K.; BLONDIN, P. The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. *Theriogenology*, v.51, p.699-708, 1999.

STUBBINGS, R.B.; WALTON, J.S. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in holstein cows. *Theriogenology*, v.43, p.705-712, 1995.

VAN DER SCHANS, A.; VAN DER WESTERLAKEN, L.A.J.; DE WIT, A.A.C.; EYESTONE, W.M.; DE BOER, H.A. Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. *Theriogenology*, v.35, p.288, 1991.

WARD, F.A.; LONERGAN, P.; ENRIGHT, B.P.; BOLAND, M.P. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. *Theriogenology*, v.54, p.433-446, 2000.

# **3º painel: Sexagem de espermatozóides e de em- briões**

---

## **Prelecionistas**

Marcos Fernando de Rezende Matta  
Marco Antônio Machado

## **Moderador**

Ademir de Moraes Ferreira



# Imunossexagem de espermatozóides

*Marcos Fernando de Rezende Matta*

## Introdução

A pré-seleção do sexo, antes da fecundação, tem gerado enorme interesse por parte de todos os envolvidos nas pesquisas voltadas para a determinação do sexo. A preferência por um dos sexos tem sido descrita desde os primórdios da humanidade (Steen et al., 1975; Egozcue, 1993; Laland et al., 1994). A influência social e cultural sobre o descendente, de determinado sexo, tem sido documentada ao longo da história (Gledhill, 1983; Egozcue, 1993; Shushan et al., 1993; Grazi et al., 1994; Shenfield, 1994).

A pré-seleção do sexo pode também ser alternativa terapêutica nos casos de desordens genéticas ligadas aos cromossomos sexuais (Veit et al., 1988; Johnson et al., 1994). Na população humana, desordens como a distrofia muscular, a síndrome da fragilidade do cromossoma "X", hemofilia, síndrome de Lesch-Nyhan, síndrome de Hunter e síndrome da feminização testicular podem ser citadas de mais de 400 tipos de desordens ligadas aos cromossomos sexuais (Schuiman, 1993; Shushan et al., 1993; Seidel e Johnson, 1999).

O controle do sexo, nos sistemas de produção animal, apresenta enorme interesse preservacionista e econômico. A aplicação potencial para um método de seleção do sexo antes da concepção dos animais inclui rápido aumento do estoque de pequenas criações, facilita o manejo de espécies em extinção ou de difícil criação e também é extensivo aos animais usados para alimentação humana. O controle da taxa de sexo em criação de gado, aves e outros animais induz ao aumento na eficiência da produção.

Não se dispõe ainda de método rotineiro e seguro para a separação das duas populações de espermatozóides (Hossain et al., 1998). As diferentes metodologias empregadas no fracionamento do sêmen, como a exploração da diferença da massa de cada população, a motilidade, carga elétrica da superfície celular e conteúdo de DNA, ainda não promoveram com segurança, rapidez e de forma econômica a separação destas duas populações de células.

De acordo com Johnson et al. (1987), o aumento de uma das duas populações de espermatozóides portadores do cromossoma "X" ou "Y" deverá elevar o ganho genético e aumentar a eficiência da produção animal. A pré-seleção do sexo pode ser útil para criadores de diversas espécies animais, pois, selecionando o sexo da prole, eles podem aumentar a eficiência de seus rebanhos. Interesses científicos e econômicos têm direcionado esforços para determinar um método prático para a separação de fêmeas e machos viáveis (Seidel et al., 1982; Morel et al., 1988).

A determinação do sexo em embriões antes da implantação é muito usada, tanto na Medicina Humana quanto na Veterinária; entretanto, nenhuma técnica é ainda economicamente viável em função da laboriosa confecção e da necessidade de pessoal especializado e de alto custo. As metodologias disponíveis empregam métodos invasivos em que ocorre a retirada de blastômeros, seguindo-se análise por cariotipagem ou por intermédio de sondas de DNA "Y" específicas.

A identificação de uma proteína específica na membrana plasmática para ambos espermatozóides "X" e "Y" pode gerar grandes oportunidades para a escolha do sexo (Hendriksen, 1999). Ela pode permitir o desenvolvimento de um ou mais anticorpos antiproteína X ou antiproteína Y viabilizando a separação por meio de técnicas imunológicas. Atualmente, apenas a citometria de fluxo consegue separar espermatozóides "X" e "Y" com alta fidelidade. Entretanto, esse método requer equipamentos caros e tanto o tempo quanto o número de espermatozóides separados por dia é limitado. Métodos imunológicos simples e com equipamentos de baixo custo podem ser aplicados, possibilitando uma separação dos espermatozóides em larga escala, evitando o uso de corantes de DNA e excitação por raio laser, com possível efeito negativo no espermatozóide e na viabilidade do embrião precoce (McNutt et al., 1996).

## Revisão bibliográfica

O antígeno H-Y é um epitopo antigênico macho específico que foi descrito pela primeira vez em 1955 por Eichwald e Silmsen. Eles descobriram que a fêmea de

camundongo rejeitava enxerto de pele de camundongo macho isogênico, enquanto o transplante entre todas as outras combinações macho/fêmea não resultava em rejeição. De 1971 em diante, vários estudos sobre anticorpos contra o antígeno H-Y tem sido publicado (Golberg et al., 1971; Wiberg, 1987). Anticorpos anti-H-Y têm sido publicados para distinguir com êxito parcial embriões machos de fêmeas (Booman et al., 1989; Veerhuis et al., 1994; White et al., 1988). A expectativa de que o anticorpo anti-H-Y poderia produzir um método de sexagem de embriões aplicáveis em animais domésticos na prática nunca foi cumprida. A razão sugerida para explicar esta falha foi a baixa afinidade do anticorpo em combinação com uma ligação considerável para células fêmeas (Veerhuis et al., 1994). Anticorpos anti-H-Y ligados somente à fração do espermatozóide indicaram que a presença do antígeno H-Y era restrita ao espermatozóide Y. A preferência por anticorpos anti-H-Y ligados ao espermatozóide Y foi reportada por Bennett e Boyse (Bennett e Boyse, 1973), Zavos (Zavos, 1983) e Ali (Ali et al., 1990). Outros não acharam evidências de que o antígeno H-Y esteja preferencialmente presente no espermatozóide Y (Hoppe e Coll, 1984; Ohno e Wachtel, 1978). Estudos realizados nesses anos foram dificultados por falta de um método confiável para estimar a porcentagem de espermatozoides X e Y em diferentes frações. O método de separação por citometria de fluxo promoveu a oportunidade de testar a ligação do anticorpo anti-H-Y diretamente em frações enriquecidas de espermatozoides X e Y. Tem sido relatado que os anticorpos usados nesse estudo se ligam preferencialmente a embriões machos de bovino (Booman et al., 1989) ou espermatozoides Y de touros (Ali et al., 1990). Os anticorpos ligaram em uma proporção similar (20 a 50%) de espermatozoides X e Y separados, ambos de touro e porco (Hendriksen et al., 1993). Em adição, uma forte ligação foi encontrada em espermatozoides mortos, indicando um reconhecimento de uma proteína intracelular presente em todos os espermatozoides (Hendriksen et al., 1993). Usando uma diferente aproximação, descobriram que anticorpos anti-H-Y faziam uma ligação similar em espermatozoides X e Y de humanos.

A identificação dos epitopos H-Y permitiram um avanço nos estudos com anticorpos H-Y. Os epitopos H-Y são pequenos peptídeos de oito a onze aminoácidos que são derivados de uma clivagem proteolítica de uma grande proteína intracelular (Greenfield et al., 1996; Sott et al., 1995; Wang et al., 1995). Os peptídeos H-Y estão presentes na molécula do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) na superfície celular. No momento, três epitopos H-Y foram identificados em camundongo, enquanto se espera que existam mais epitopos H-Y. Dois epitopos são codificados por diferentes exons do gene *Smcy*, enquanto o terceiro epitopo é codificado por outro gene, *Uty* (Greenfield

et al., 1996; Sott et al., 1995; Simpson et al., 1997). Ambos os genes têm homólogos no cromossoma X, *Smcx* e *Utx*, que se diferem consideravelmente na região em que o epitopo H-Y é expresso (Greenfield et al., 1996; Sott et al., 1995; Simpson et al., 1997).

Também em humanos, dois peptídeos derivados *SMCY* manifestando atividade H-Y foram identificados (Meadows et al., 1997; Wang et al., 1995). Um desses peptídeos difere somente em dois aminoácidos do peptídeo derivado do *SMCX*, no qual é também encontrado na molécula de MHC na superfície celular. A análise por Southern Blot detectou seqüências relacionadas com *Smcy* no cromossoma Y no porco e no cavalo, mas não em bovinos e coelhos (Agulnik et al., 1994). Portanto, em coelho e bovino a cópia de X da *Smcy/Smcx* pode ser resultante da própria função da cópia de Y. Em camundongos, *Smcy*, *Uty*, *Smcx* e *Utx* são expressados em muitos tipos celulares diferentes, com a primeira expressão de *Smcy* e *Smcx* começando no camundongo no estágio de duas células (Agulnik et al., 1994). As funções dos genes são desconhecidas; a homologia da seqüência do nucleotídeo com outros genes sugere uma função na regulação transcricional (Scott et al., 1997; Simpson et al., 1997). A produção de anticorpos específicos para esses peptídeos não tem sido ainda reportado. Se desta maneira os anticorpos podem ser feitos, eles podem atuar especificamente para cada espécie. Em adição, indivíduos expressando diferentes moléculas de MHC ou HLA apresentam diferentes epitopos H-Y na superfície celular (Falk et al., 1990), indicando a necessidade de um conjunto de anticorpos para cobrir todos os epitopos H-Y dentro das espécies. Os exemplos de ligações reportados de prováveis anticorpos ligantes ao antígeno H-Y usados até hoje indicam que esses anticorpos se ligaram a outras moléculas em vez de a epitopos H-Y identificados recentemente. De fato, dois genes têm sido identificados para codificar uma proteína reconhecida por anticorpos anti-H-Y, e esses são diferentes de *Smcy* e *Uty* e localizam-se nos autosomas: macho acrescentado de antígeno 1 e 2 (*Mea-1* a *Mea-2*), segundo Lau et al., 1989 e Su et al., 1992. A expressão padrão de ambos *Mea-1* e *Mea-2* sugere uma função na espermatogênese (Kondo et al., 1997; Kondo et al., 1996; Lau et al., 1989). Se anticorpos específicos para o *Smcy* e *Uty* derivados de epitopos H-Y podem ser produzidos, então esses devem produzir novas perspectivas para sexagem de embriões e talvez também para espermatozóides X e Y (Hendriksen, 1999).

# Sexagem de embriões

*Marco Antônio Machado*

*Sílvia Graciela Torres Gilardi*

## Introdução

O conhecimento do sexo de embriões é de grande importância para a pecuária, tanto de leite como de carne. Na pecuária leiteira, as fêmeas produzidas são utilizadas para reposição nos rebanhos e por isso são mais facilmente comercializadas. Por outro lado, os machos produzidos possuem pouco valor comercial, a não ser que possuam alto valor genético e possam ser utilizados como reprodutores. Na pecuária de corte, seria interessante o nascimento de maior número de machos, devido ao maior ganho de peso. O conhecimento do sexo dos embriões facilita a obtenção de produtos desejados, reduzindo o custo e o prazo para formar as populações desejadas.

O grande avanço das tecnologias reprodutivas, principalmente a técnica de fertilização *in vitro* (FIV), permitiu que a técnica de sexagem de embriões se desenvolvesse bastante nos últimos anos, e hoje é possível obter alta confiabilidade e alta taxa de prenhez confirmada (Martinez *et al.*, 2000).

Embriões de um mesmo sexo podem também ser produzidos indiretamente por meio da sexagem de espermatozóides, antes da produção dos embriões. Uma técnica de sexagem espermática que vem sendo investigada é a citometria de fluxo, que se baseia na separação dos espermatozóides devido à diferença na quantidade de DNA que cada um possui. O espermatozóide que carrega o cromossomo X possui mais DNA do que o espermatozóide que carrega o cromossomo Y. Portanto, o equipamento consegue separar os espermatozóides

machos dos espermatozóides fêmeas. Esta técnica ainda precisa ser melhorada, pois o procedimento de separação é um processo lento (cerca de 1.000 espermatozóides por segundo), a precisão é de apenas 90% e ocorre, ainda, uma certa danificação dos espermatozóides no processo, reduzindo a fertilidade do sêmen (Johnson, 1995).

Novos procedimentos de sexagem embrionária, baseados em métodos imunológicos não-invasivos, estão sendo investigados. Blecher *et al.* (1999) descreveram um método que se baseia na purificação de proteínas sexo-específicas e no desenvolvimento de anticorpos contra estas proteínas. Os anticorpos específicos se ligam na membrana do espermatozóide e possibilitam o desenvolvimento de procedimentos viáveis de sexagem de espermatozóides. Uma vez que se desenvolva uma boa metodologia de sexagem de sêmen, a aplicabilidade desta técnica será imediata e amplamente difundida na pecuária.

O maior desafio das técnicas de sexagem de embriões se baseia no fato de que o método ideal deve apresentar uma determinação sexual altamente específica aliada à alta taxa de gestação confirmada após a transferência dos embriões. A sexagem de embriões pode ser realizada por meio de várias metodologias, que podem utilizar procedimentos invasivos ou não-invasivos.

## Métodos não-invasivos

Os métodos não-invasivos são considerados ideais pois não afetam a integridade do embrião e são menos prováveis de diminuir o potencial de sucesso da transferência e implantação do embrião. Dois métodos foram desenvolvidos: monitoramento da atividade de enzimas ligadas à inativação do cromossomo X e reações imunológicas com anticorpos contra antígenos ligados ao cromossomo Y.

### Monitoramento de enzimas ligadas ao cromossomo X

Para manter a equivalência no número de genes entre os sexos em mamíferos, um dos cromossomos X da fêmea é inativado, em cada célula, no início da embriogênese. Apesar de não se saber ao certo o momento exato da inativação do X, existe um pequeno período onde ambos os cromossomos X estão ativos, ocorrendo transcrição gênica. A atividade de ambos os cromossomos pode ser notada pela atividade de certas enzimas ligadas ao cromossomo X, que apresentam o dobro da atividade se comparadas às enzimas autossomais.

Em estudos realizados por Williams *et al.* (1986), embriões no estágio de mórula e blástula foram examinados quanto a atividade da enzima glicose-6P-DH. Os embriões foram cultivados em meio contendo o substrato glicose 6-P e indicador de cor. A intensidade da coloração obtida indica maior ou menor atividade da enzima, ou seja, embriões que apresentaram coloração mais intensa eram preferencialmente fêmeas, e embriões com coloração menos intensa eram preferencialmente machos. A eficiência conseguida neste experimento foi de 65%.

Monk e Handyside (1988) utilizaram a enzima hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT), ligada ao cromossomo X, e como controle a enzima autossomal adenina fosforibosil transferase (APRT). Pela relação das atividades HPRT:APRT foi possível determinar, com 90% de eficiência, o sexo de embriões de camundongos.

De maneira geral, estes métodos em que se utiliza coloração apresentam uma certa toxicidade aos embriões, com altas taxas de mortalidade. Outro fator negativo é que, em bovinos, a inativação do cromossomo X ocorre mais tardiamente (8-16 células), se comparado a camundongos (8 células), podendo portanto haver uma tradução de mRNA materno que foi armazenado e mascarar o efeito da atividade transcricional diferencial, oriunda da inativação cromossomal (Betteridge, 1988).

## Antígenos ligados ao cromossomo Y

Foi demonstrado que existem antígenos sexuais específicos de histocompatibilidade em Y (H-Y). Fêmeas de camundongo rejeitaram transplantes de tecido de machos da mesma ninhada, embora não tenha ocorrido rejeição quando tecido de fêmeas foram transplantados em machos (Eichwald e Silmser, 1955). A função destes antígenos ainda não é conhecida; no entanto, um gene foi identificado e está localizado no braço longo do cromossomo Y (Simpson *et al.*, 1987).

Dois métodos foram desenvolvidos para a detecção de antígenos H-Y: método citotóxico e método imunofluorescente. O método citotóxico baseia-se na exposição do embrião a um anti-soro diluído anti H-Y. Embriões que expressam antígeno anti H-Y apresentam lise celular e portanto são designados machos. Em um experimento realizado com 1.000 embriões de camundongo, em que se usou sexagem citotóxica, 479 (48%) foram afetados e portanto considerados

machos. Os embriões não afetados pela toxicidade do método foram transferidos, dos quais 50 dos 58 filhotes nascidos foram fêmeas (White *et al.*, 1982). Apesar de sensível, esta técnica apresenta baixa taxa de sobrevivência de embriões, além do fato de que os embriões machos são destruídos (Vliet *et al.*, 1989).

O método imunofluorescente baseia-se na exposição dos embriões a anticorpos primários H-Y por 30 minutos, seguida de uma exposição a um anticorpo secundário conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Os embriões são então submetidos à microscopia fluorescente para detectar os sinais de FITC (Watchtel, 1984). White *et al.* (1987) utilizaram 258 embriões bovinos com o método imuno-fluorescente e encontraram 132 embriões fluorescentes e 126 não-fluorescentes. Utilizando métodos citogenéticos para validar estes resultados, foram encontrados 79% de confirmação para os genótipos XY e 89% para os genótipos XX. Experimentos com um número maior de embriões são necessários para validar a sensibilidade do método, bem como avaliar a taxa de sobrevivência dos embriões transplantados (Vliet *et al.*, 1989).

## Métodos invasivos

Métodos invasivos baseiam-se na retirada de uma amostra de células do embrião. Os embriões de muitas espécies de animais resistem ao trauma provocado pela biópsia; no entanto, este procedimento requer equipamentos extras e habilidade para proceder à biópsia. Mesmo assim, os melhores resultados obtidos com metodologias para sexagem de embriões são conseguidos com métodos invasivos (Bredbacka, 2000).

Dois procedimentos são utilizados para proceder à biópsia do embrião: aspiração e microseção. Na técnica de aspiração, o embrião é estabilizado utilizando uma pipeta de sucção controlada, sendo os blastômeros aspirados com outra pipeta. Na técnica de microseção, um pedaço do embrião é cortado com uma microlâmina, num movimento vertical. O embrião é estabilizado utilizando um meio livre de proteínas ou por meio de ranhuras no fundo da placa (Bodo *et al.*, 2001).

As taxas de gestação de embriões que sofreram biópsias são comparáveis às taxas obtidas com embriões intactos (53-71%). Embriões de boa qualidade são menos afetados pela biópsia e portanto são os preferencialmente utilizados para a sexagem (Thibier e Nibart, 1995; Shea, 1999).

## **Análise citogenética**

Estes métodos envolvem a biópsia de um pequeno número de células que são cultivadas em presença de um agente que faz com que as células sejam mantidas na fase de metáfase. As células são então induzidas a inchar e os cromossomos se dispersam. As células são fixadas numa lâmina, coradas com corantes específicos para DNA (ex. Giemsa) e observadas com microscópio. As células em metáfase apresentam os cromossomos espalhados que podem ser identificados pelo bandeamento. O cromossomo Y é facilmente detectado devido ao seu pequeno tamanho e pelo seu braço longo que é altamente heterocromático (King, 1984).

A sensibilidade deste método é quase que absoluta, porém, é difícil conseguir biópsias que possuam metáfases de boa qualidade. Outro aspecto complicador neste método é que ele requer citogeneticistas bem treinados e é bastante demorado, cerca de 5 horas para analisar de 12 a 15 embriões (Booman, 1986). Uma vantagem da análise citogenética, ou cariotipagem, é que este método pode detectar aberrações cromossômicas simultaneamente. Mesmo com todo o progresso obtido no refinamento das técnicas de cariotipagem, este método continua sendo considerado tecnicamente complicado e demorado (Bredbacka, 2000).

Um método alternativo para detecção de cromossomos é a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), que se baseia na hibridização de fragmentos de DNA específicos com o núcleo da célula. Uma vantagem da técnica de FISH sobre uma cariotipagem convencional é que núcleos interfásicos podem ser analisados, além do tempo de análise que pode ser de apenas uma hora (Kobayashi *et al.*, 1998).

## **Sondas específicas para o cromossomo Y**

A técnica de sondas específicas para o cromossomo Y baseia-se na biópsia de um pequeno número de células do embrião e na hibridização do DNA total destas células com uma sequência marcada de DNA que é específica para o cromossomo Y.

Esta técnica foi desenvolvida a partir dos resultados das pesquisas com o fator de determinação da testis (TDF), que está envolvido no desenvolvimento do testículo e cujo gene está situado no cromossomo Y. Em humanos, o gene TDF está localizado no braço curto do cromossomo Y, próximo à região pseudo-

autossômica (Page *et al.*, 1987). As pesquisas com TDF geraram bastante informações sobre o cromossomo Y humano e sua correlação com o cromossomo Y de outras espécies, levando ao isolamento de seqüências de DNA específicas para Y (Vliet *et al.*, 1989).

A primeira aplicação clínica das sondas de DNA específicas de Y foi na determinação pré-natal do sexo de humanos. O objetivo destes estudos era determinar o sexo de um feto com risco de apresentar doenças ligadas ao cromossomo X, onde os fetos masculinos poderiam ser abortados (Gosden *et al.*, 1982).

As primeiras sondas utilizadas, específicas de Y, eram de seqüências repetidas, que estão presentes em múltiplas cópias no cromossomo, em regiões heterocromáticas. Estas sondas, no entanto, apresentam regiões interespaçadas com seqüências não-específicas de Y, e que podem resultar numa hibridização não-específica e levar a resultados falso-positivos. O uso de sondas de Y, de cópia única, aumenta significativamente a precisão da técnica, no entanto, reduz a intensidade do sinal de hibridização. Devido a estas dificuldades técnicas, esta metodologia não é muito utilizada na determinação do sexo de embriões de animais.

## Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) (Mullis e Faloona, 1987) é uma técnica que amplifica seqüências específicas de DNA e consiste de vários ciclos de três etapas: desnaturação da seqüência molde, ligação dos *primers* (oligonucleotídeos curtos sintetizados) e extensão da cadeia. Depois da liberação do material genético das células, as fitas de DNA complementares são separadas por desnaturação térmica ( $> 90^{\circ}\text{C}$ ). No resfriamento, dois *primers* sintetizados (seqüência conhecida) irão se ligar nas regiões homólogas específicas na seqüência do DNA alvo, um *primer* em cada fita. A temperatura é então aumentada para  $72^{\circ}\text{C}$ , que é a temperatura ideal para a enzima DNA polimerase resistente ao calor (*Taq* polimerase). Utilizando os nucleotídeos livres, a *Taq* polimerase começa a sintetizar DNA complementar à seqüência alvo, a partir do local onde o *primer* se ligou (extensão da cadeia). Os *primers* são orientados em sentidos opostos, de maneira que a extensão de um cria um novo sítio de ligação para o outro. Desta maneira, a amplificação é exponencial: em cada ciclo, a quantidade de produtos alvos é dobrada. Teoricamente, 30 ciclos são capazes de amplificar uma seqüência em bilhões de vezes. Os produtos de PCR são submetidos a uma

eletroforese em géis de agarose e coloração com brometo de etídio ou géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata.

A temperatura ótima para a ligação dos *primers* é específica, usualmente 50–60°C para um *primer* de 20 nucleotídeos. Em temperaturas mais baixas, os *primers* irão se ligar em regiões onde não ocorre uma complementaridade perfeita, resultando em produtos de amplificação não-específicos.

A técnica típica de sexagem de embriões por PCR envolve a amplificação simultânea de uma sequência do cromossomo Y e de uma sequência autossomal, que funciona como controle para a presença de material coletado na biópsia e para as condições apropriadas de amplificação. A técnica de PCR é ajustada para que os produtos de amplificação, oriundos do cromossomo Y e autossomal, sejam fragmentos de tamanhos diferentes, os quais são separados por eletroforese em géis de agarose ou poliacrilamida (Bredbacka, 2000). Após a biópsia, a sexagem por PCR leva em torno de duas a três horas. O sucesso da técnica vai depender da qualidade da biópsia, do protocolo de PCR utilizado e do sistema de detecção utilizado. Comercialmente, a eficiência de sexagem, que mede a proporção de amostras diagnosticáveis, tem sido de 90 a 95%, e a precisão da técnica entre 93 e 98% (Thibier e Nibart, 1995; Roschlau et al., 1997; Shea, 1999). Os passos utilizados para a sexagem de embriões, envolvendo a biópsia com subsequente análise por PCR, estão descritos na Fig. 1.

## ***Protocolos especiais utilizando PCR***

### ***Nested PCR***

Esta técnica foi desenvolvida visando aumentar a especificidade e sensibilidade da técnica de PCR. A amplificação do DNA ocorre em duas etapas, e a primeira amplificação utiliza *primers* externos às sequências alvo para os *primers* internos, utilizados na segunda reação. Os produtos resultantes da primeira amplificação servem como molde para a segunda amplificação, onde são utilizados os *primers* internos. O aumento da especificidade geral com esta técnica permite uma amplificação moderadamente não-específica na primeira amplificação, que utiliza uma temperatura de anelamento mais baixa. Esta técnica é especialmente indicada quando se deseja amplificar o DNA a partir de pequenas quantidades, como encontrado em gametas individuais ou blastômeros. A amplificação de DNA nestas condições é altamente afetada pela pequena proporção de DNA alvo, em relação às concentrações dos *primers* e reagentes (Ruano et al., 1989).

Visando aprimorar a técnica de *Nested PCR*, na sexagem de embriões bovinos, Kirckpatrick e Monson (1993) desenvolveram uma técnica de *Nested PCR* acoplada com uma amplificação alelo-específica de seqüências homólogas do cromossomo X e Y. O segmento do genoma bovino amplificado com esta técnica é uma região comum aos cromossomos X e Y, denominada região pseudo-autossomal. A primeira amplificação envolve a utilização de um par de *primers* que se liga na mesma região nos cromossomos X e Y. A segunda amplificação (*Nested*) utiliza *primers* internos, sendo um par específico para o cromossomo X e um par específico para o cromossomo Y. Uma alíquota da primeira amplificação é utilizada como DNA molde para a segunda amplificação, que é realizada com a presença dos dois pares de *primers* simultaneamente. O par de *primers* de X gera um produto de 247 pares de base (pb) e o par de *primers* de Y gera um produto de 167pb. Os autores utilizaram biópsias de embriões bovinos com 2-8 células e conseguiram determinar o sexo de 38 em 40 biópsias realizadas. A correta identificação do sexo foi detectada em 17 de um total de 18 gestações confirmadas.

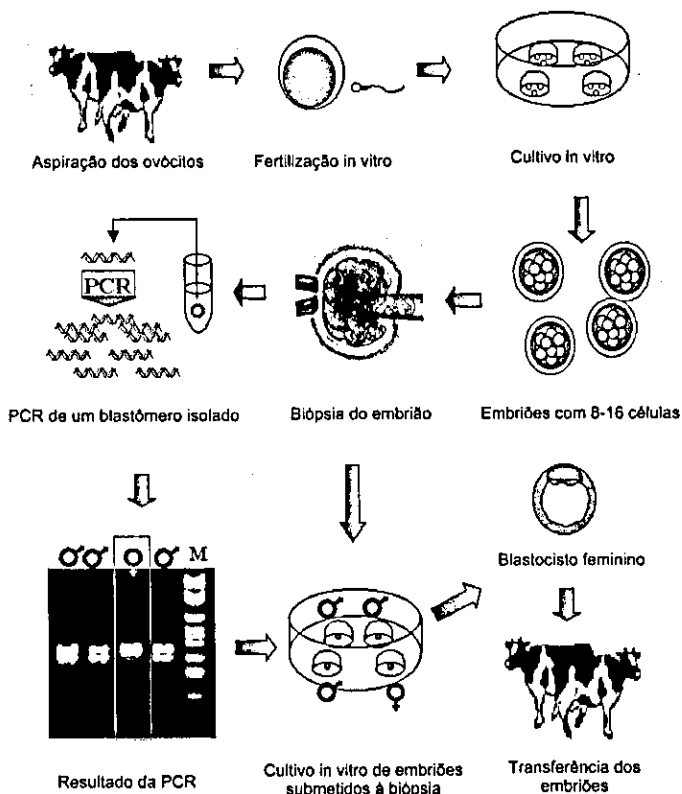
### *Pré-amplificação com primers degenerados*

Uma alternativa às duas amplificações específicas da técnica de *Nested PCR* se baseia na amplificação de todo o genoma na primeira amplificação e utilizar uma alíquota desta para a segunda amplificação. Telenius *et al.* (1992) utilizaram um *primer* degenerado para realizar uma amplificação universal (DOP-PCR). Neste procedimento, um *primer* degenerado, de seqüência aleatória é utilizado na primeira amplificação. Nesta etapa, a temperatura de ligação do *primer* é baixa (cerca de 30°C) para possibilitar pareamentos inespecíficos, permitindo a amplificação de um grande número de seqüências no genoma.

Zhang *et al.* (1992) utilizaram uma mistura de *primers* curtos (15 pb), de seqüências aleatórias, para amplificar o genoma inteiro de uma única célula. Este procedimento, denominado de *primer extension preamplification* (PEP-PCR), utiliza baixas temperaturas de ligação para possibilitar um pareamento não-específico dos *primers* e amplificar todo o genoma.

Ao contrário da técnica de PCR convencional, a amplificação pela técnica de DOP-PCR ou PEP-PCR é linear em vez de exponencial, pois ocorre uma limitação da síntese de DNA pela quantidade da enzima Taq polimerase, devido ao grande número de regiões onde ocorrem pareamento dos *primers*. Como resultado, estas

técnicas resultam num aumento de cerca de 60 vezes na quantidade de DNA, utilizando de 30 a 50 ciclos de PCR, em contraste ao aumento de bilhões de vezes de uma região específica no PCR convencional.



**Fig. 1.** Procedimentos empregados na sexagem de embriões bovinos, utilizando biópsia de células e análise por PCR, com o uso de um par de primers específicos para o cromossomo Y e um par de primers específicos para um cromossomo autossômico. Fonte: Bodo et al. (2001).

As técnicas de amplificação de todo o genoma são indicadas, não somente para aumentar a sensibilidade da técnica de sexagem de embriões, mas também para permitir a amplificação de vários genes de interesse no genoma, visando realizar diagnósticos genéticos para diversas características de interesse (Hocman et al., 1996; Chrenek et al., 2001).

## Considerações finais

Uma metodologia de rotina para a sexagem de embriões deve incluir uma sexagem de alta especificidade, seguida de uma eficiente transferência de embriões. Visando à aceitação comercial, a metodologia de sexagem deve ser fácil de usar, rápida e de custo aceitável.

Em relação aos métodos não-invasivos, apesar de serem tecnicamente simples, eles apresentam uma certa toxicidade aos embriões, com altas taxas de mortalidade. O desenvolvimento de kits imunológicos de alta sensibilidade e de fácil detecção poderá aumentar as chances de aceitação comercial destes métodos.

Quanto aos métodos invasivos, a análise citogenética produz resultados muitos precisos; no entanto, somente 60-70% dos embriões podem ser sexados, além do fato de que a técnica é bastante demorada (duas pessoas altamente treinadas são capazes de analisar apenas de 12 a 15 embriões/dia). Devido a estes fatores, esta técnica possui pequena aceitação comercial.

As sondas específicas para o cromossomo Y apresentam poucas chances de serem empregadas comercialmente, devido à complexidade da técnica de hibridização de DNA. Sondas de sequência repetida apresentam sinais fortes de hibridização, no entanto apresentam baixa especificidade, levando ao aparecimento de falso-positivos. As sondas de cópia única produzem um resultado altamente específico, no entanto apresentam a intensidade de sinal bastante diminuída. Por causa destas dificuldades, esta técnica não é muito utilizada na determinação do sexo de embriões de animais.

A técnica de PCR possui várias vantagens sobre as demais técnicas, sendo utilizada comercialmente na sexagem de embriões. Uma biópsia de uma única célula de um embrião é suficiente para a sexagem em que se utiliza a técnica de PCR. Esta técnica é extremamente rápida, levando apenas de duas a três horas, após a biópsia, para o resultado da sexagem. A rapidez da técnica aumenta grandemente a taxa de gestação confirmada. A sensibilidade da técnica de PCR é altíssima, podendo ser melhorada ainda mais, se utilizadas modificações como *Nested* PCR e PCR alelo específico. Além da sexagem de embriões, a técnica de PCR pode ser utilizada para a amplificação de vários genes de interesse no genoma, a fim de realizar diagnósticos genéticos para diversas características de interesse.

A Embrapa Gado de Leite vem realizando a sexagem de embriões com o uso da técnica de PCR e, em breve, este método fará parte da rotina de produção de embriões bovinos, permitindo o desenvolvimento da pesquisa sobre fatores que participam do desenvolvimento embrionário e que podem estar ligados ao sexo dos embriões.

## Referências bibliográficas

- BETTERIDGE, K.J. The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology*, v.29, p.155-158, 1988.
- BLECHER, S.R.; HOWIE, R.; LI, S.; DETMAR, J.; BLAHUT, L.M. A new approach to immunological sexing of sperm. *Theriogenology*, v.52, p.1309-1321, 1999.
- BODO, S.; BARANYAI, B.; GOCZA, E.; DOHY, J.; MARKKULA, M. Preimplantation genetic diagnosis in cattle: a review. *Acta Veterinaria Hungarica*, v.49, p.99-109, 2001
- BOOMAN, P. Control of sex ratio by sexing sperm and embryos. In: *Exploiting new technologies in animal breeding: genetic developments*. New York: Oxford Science Publications, 1986. p.13-22.
- BREDBACKA, P. Progress on methods of gene detection in preimplantation embryos. *Theriogenology*, v.55, p.23-34, 2000.
- CHRENEK, P.; BOULANGER, L.; HEYMAN, Y.; UHRIN, P.; LAURINCIK, J.; BULLA, J.; RENARD, J.P. Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. *Theriogenology*, v.55, p.1071-1081, 2001.
- EICHWALD, E.J.; SILMSER, C.R. Untitled publication. *Transplantation Bulletin*, v.2, p.148-149, 1955.
- Gosden, J.R.; Mitchell A.R.; Gosden, C.M., Rodeck, C.H.; Morsman, J.M. Direct vision chorion biopsy and chromosome specific DNA probes for determination of fetal sex in first trimester prenatal diagnosis. *The Lancet*, v.2, p.1416-1419, 1982.

HOCHMAN, D.; ZARON, Y.; DEKEL, I.; FELDMESSER, E.; MEDRANO, J.F.; SHANI, M.; RON, M. Multiple genotype analysis and sexing of IVF bovine embryos. *Theriogenology*, v.46, p.1063-1075, 1996.

KING, W.A. Sexing embryos by cyhological methods. *Theriogenology*, v.21, p.7-17, 1984.

KIRKPATRICK, B.W.; MONSON, R.L. Sensitive sex determination assay applicable to bovine embryos derived from IVM and IVF. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.98, p.335-340, 1993.

KOBAYASHI, J.; SEKIMOTO, A.; UCHIDA, H.; EADA, T.; SASAKI, K.; SASADA, H.; UMEZU, M.; SATO, E. Rapid detection of male-specific DNA sequence in bovine embryos using fluorescence in situ hibridization. *Mol. Reprod. Dev.*, v.51, p.390-394, 1998.

JOHNSON, L.A. Sex preselection by flow cytometric separation of X- and Y-chromosome bearing sperm based on DNA difference: a review. *Reprod. Fert. Develop.*, v.7, p.893-903, 1995.

MARTINEZ, M.L.; FERREIRA, A.M.; MACHADO, M.A. Biotecnologia na agropecuária: tecnologias reprodutivas. *Informe Agropecuário*, v.21, p.79-88, 2000.

MONK, M.; HANDYSIDE, A.H. Sexing of preimplantation mouse embryos by measurement of X-linked gene dosage in a single blastomere. *J. Reprod. Fertil.*, v.82, p.365-368, 1988.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*, v.155, p.335-339, 1987.

PAGE, D.C.; MOSHER, R.; SIMPSON, E.M.; FISHER, E.M.C.; MARDON, G.; POLLACK, J.; MCGILLIVRAY, B.; CHAPELLE, A. de la; BROWN, L.G. The sex-determining region of the human y chromosome encodes a finger protein. *Cell*, v.51, p.1091-1104, 1987.

ROSCHLAU, K.; ROSCHLAU, D.; ROSELIUS, R.; DEXNE, U.; MICHAELIS, U.; STREHL, R.; UNICKI, P.; RINK, N. Over 5 years experience in sexing of bovine morulae and blastocysts during routine embryo transfer. *Theriogenology*, v.47, p.273 abstr, 1997.

RUANO, G.; FENTON, W.; KIDD, K.K. Biphasic amplification of very dilute DNA samples via booster PCR. *Nucleic Acids Research*, v.17, p.5407, 1989.

SHEA, B.F. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reactions results: a six-year retrospective study. *Theriogenology*, v.51, p.841-854, 1999.

SIMPSON, E.; CHANDLER, P.; GOULMY, E.; DISTECHE, C.M.; FERGUSON-SMITH, M.A.; PAGE, D.C. Separation of the genetic loci for the H-Y antigen and for testis determination on human y chromosome. *Nature*, v. 326, p.876-878, 1987.

TELENIUS, H.; CARTER, N.P.; BEBB, C.E.; NORDENSKJOLD, M.; PONDER, B.A.; TUNNACLIFFE, A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate *primers*. *Genomics*, v.13, p.718-725, 1992.

THIBIER, M.; NIBART, M. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology*, v.43, p.71-80, 1995.

VLIET, R.A.; GIBBINS, A.M.V.; WALTON, J.S. Livestock embryo sexing: a review of current methods, with emphasis on y-specific DNA probes. *Theriogenology*, v.32, p.421-438, 1989.

WACHTEL, S. H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. *Theriogenology*, v.21, p.18-28, 1984.

WHITE, K.L.; ANDERSON, G.B.; BONDURANT, R.H. Expression of a male-specific factor on various stages of preimplantation bovine embryos. *Bio. Reprod.*, v.37, p.867-873, 1987.

WHITE, K.L.; LINDNER, G.M.; ANDERSON, G.B.; BONDURANT, R.H. Survival after transfer of sexed mouse embryos exposed to H-Y antisera. *Theriogenology*, v.18, p.655-662, 1982.

WILLIAMS, T.J. A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucos 6-phosphate dehydrogenase. *Theriogenology*, v.25, p.733-739, 1986.

ZHANG, L.; CUI, X.; SCHMITT, K.; HUBERT, R.; NAVIDI, W.; ARNHEIM, N. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.89, p.5847-5851, 1992.



## **4º painel: Definição dos pontos de estrangulamento na técnica de produção in vitro de embriões – Conclusões do *Workshop***

---

### **Moderador**

Ademir de Moraes Ferreira

### **Relatores**

Ademir de Moraes Ferreira  
Wanderlei Ferreira de Sá



# **Considerações sobre produção in vitro de embriões bovinos – conclusões do *Workshop***

***Ademir de Moraes Ferreira***

## **Introdução**

O *Workshop* constituiu-se numa oportunidade para o encontro de especialistas em biotecnologias de reprodução, reunindo cerca de 49 participantes, e possibilitou a discussão do conhecimento dos resultados que vêm sendo obtidos em diferentes laboratórios e dos entraves que vêm dificultando a produção in vitro de embriões (PIVE) em maior escala no Brasil, além da definição dos principais pontos de estrangulamento, sobre os quais deverão ser concentrados esforços de pesquisa para a melhoria da referida técnica. Foram discutidas também as limitações e perspectivas futuras da PIVE no País.

Cerca de 50% dos avanços alcançados na eficiência da produção de leite nos países desenvolvidos, durante a 2.ª metade do século passado, deveram-se somente à universalização de uma biotécnica de reprodução, a inseminação artificial (IA), com os demais 50% correspondendo ao somatório das melhorias sanitárias, de manejo e da nutrição. Essa afirmação de Gordon (1994) permite antever o grande impacto a ser gerado com a PIVE, uma vez melhorada a eficiência de algumas etapas do processo.

Foram considerados como os dois maiores pontos de estrangulamento para a ampla utilização da técnica em nível comercial, principalmente para rebanhos

leiteiros, a criopreservação (devido à menor disponibilidade de receptoras em relação ao gado de corte) e à sexagem dos espermatozóides (devido ao menor interesse pelos machos em gado de leite). É bom ressaltar que na própria IA usou-se sêmen fresco numa fase inicial, até que o congelamento apresentasse resultados satisfatórios, o que deverá ocorrer de maneira semelhante com os embriões de PIV.

A PIVE pode ser considerada como uma biotécnica reprodutiva de 3.<sup>a</sup> geração, com a IA representando a primeira geração e a Transferência de Embriões (TE), a de segunda geração. A TE, embora utilizada há bem mais tempo que a PIVE, não vem evoluindo em níveis desejados, apresentando os mesmos resultados de dez anos atrás, apesar dos avanços obtidos nos estudos da dinâmica folicular com o uso de ultra-som. A grande variação nas respostas superovulatórias continua como um dos grandes gargalos para a maior utilização dessa técnica. Além disso, é importante frisar que a PIVE é indispensável para os estudos e uso de novas biotecnologias como a clonagem e a transgênese.

## **Vantagens da produção in vitro (PIVE) de embriões bovinos**

Várias vantagens da utilização de PIVE foram citadas e discutidas durante o presente *Workshop*, tais como:

- Produção animal: otimizar a utilização das fêmeas de maior potencial genético, utilizar ovócitos de animais prenhes, bezerras e de vacas velhas, bem como de animais com problemas de fertilidade, daqueles que não respondem à superovulação e até de animais mortos;
- Preservação de espécies;
- Suporte ao desenvolvimento de novas biotécnicas (clonagem, transgênese), marcadores genéticos, formação de gêmeos idênticos;
- Estudos básicos sobre a maturação in vitro (MIV) dos ovócitos e desenvolvimento embrionário;
- Potencial superior à TE para multiplicação de genótipos melhorados.

## Limitações da técnica de PIVE

Entre as limitações descritas para a utilização da PIVE, foram destacadas:

- A necessidade de energia elétrica constante no Laboratório;
- Recursos humanos especializados;
- Qualidade da água (fator preponderante);
- Custo x benefício atual: Índices de várias etapas do processo podem ser melhorados como na maturação de ovócitos (MIV), Fertilização (FIV) e Cultivo in vitro (CIV), criopreservação de embriões etc.;
- Variabilidade na eficiência do sêmen (touro apresentam resultados diferentes);
- Baixa eficiência na criopreservação de embriões de PIV, bem como de ovócitos, resultando em taxa de gestação insatisfatória;
- Menor viabilidade (competência) dos ovócitos de bezerras;
- Custo de receptoras (poderia ser reduzido pela maior eficiência da criopreservação de embriões de PIV);
- Variação individual entre doadoras de ovócitos (14% a 54% de blastocistos);
- Variações entre operadores (taxa de recuperação e lesões de ovários);
- Estação do ano e qualidade de ovócitos.

## Linhas de pesquisa na PIVE

Durante o *Workshop* foram citadas várias linhas de pesquisas que necessitam ser intensificadas visando à melhoria na eficiência do protocolo de PIVE:

- Maior quantidade e melhor qualidade dos ovócitos (estudos sobre retenção de meiose, tratamentos hormonais, recrutamento de folículos, alimentação, idade, temperatura ambiente, sanidade, melhoria da eficiência de ovócitos de bezerras pré-púberes, alterações ovarianas após sucessivas punções etc.);
- Determinação prévia da eficiência do sêmen para PIVE (reação acrossômica induzida, teste de ligação à ZP, teste de penetração, proteínas do sêmen etc.);
- Fatores que interferem na maturação in vitro (MIV) dos ovócitos: variações individuais, tamanho do folículo (> 4 mm), melhor fase do ciclo estral, qualidade do ovócito, melhoria dos meios de MIV etc.;

- Fatores que interferem na fecundação in vitro (FIV): qualidade ou eficiência do sêmen, capacitação espermática, concentração de espermatozóides, injeção intracitoplasmática;
- Fatores que interferem no desenvolvimento do embrião: meios de cultivo;
- Fatores que interferem na taxa de gestação: morte embrionária, criopreservação (congelamento de embrião PIV é problemática);
- Sexagem de espermatozóides.

## Perspectivas para o uso comercial da técnica

Uma das conclusões do *Workshop* é de que a biotecnologia reprodutiva em questão (PIVE) poderia se tornar viável economicamente e daí ser utilizada em escala comercial mais rapidamente em duas situações:

- Disponibilidade de espermatozóides sexados para serem usados na PIVE, associada a uma maior taxa de gestação com embriões de PIVE criopreservados (40%);
- Eficiência de 50% na produção de embriões a partir dos ovócitos coletados e de 50% na taxa de gestação, ou seja, para cada 100 ovócitos uma produção de 50 embriões e de 25 gestações.

A produção in vitro de embriões (PIVE) pode caminhar de maneira semelhante à inseminação artificial, acreditando-se que uma eficiente congelamento dos embriões possa permitir a obtenção de gestações a um custo próximo de R\$ 50,00, valor que seria reduzido trabalhando-se com vacas de excelente *pedigree*, a serem descartadas, nas quais não se utilizasse a aspiração.

## A parceria Embrapa e Epamig

Em maio de 2001 foi assinado o Convênio Embrapa Gado de Leite/Embrapa Milho e Sorgo/Epamig, tendo como objetivos iniciais: a) promover pesquisas

para melhoria da eficiência de diversas etapas do protocolo da biotécnica de produção in vitro de embriões, visando à utilização em grande escala e de maneira econômica; b) fornecer embriões F1 (meio-sangue) resultantes das pesquisas conduzidas para atender um programa de grande impacto elaborado e conduzido pela Epamig, o qual já foi referendado como parte integrante do Programa Referencial de Qualidade, coordenado pela Secretaria de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Atingidos índices que tornem a técnica de PIVE viável economicamente, é possível que essa técnica seja usada à semelhança da inseminação artificial, com grande parte dos produtores de Minas Gerais tendo à disposição embriões F1 para serem colocados no útero das receptoras (barriga de aluguel) sete dias após o cio. Esse o objetivo final do programa: "Abastecer Minas Gerais de animais/embriões meio-sangue (F1)", cuja demanda é crescente.

O programa estaria alicerçado na produção de leite com animais F1 (meio-sangue), o que exige uma oferta contínua de embriões com esse grau de sangue, de maneira a permitir ao produtor manter o seu rebanho estável nesse grau de sangue, o que não se pode conseguir com o uso da inseminação artificial (sêmen). Embora esse seja um anseio da maioria de nossos produtores, programas semelhantes não têm sido praticado até o momento em qualquer parte do mundo tropical. A Embrapa Milho e Sorgo colocaria à disposição do Programa uma área para manutenção de um número representativo de receptoras.

## **Laboratórios regionais de produção in vitro de embriões (PIVE)**

Para a operacionalização de um programa de tal envergadura, será imprescindível a criação de Laboratórios Regionais de Produção in vitro de embriões (PIVE), a serem instalados em regiões estratégicas do Estado, cujos técnicos serão treinados e estarão sob a orientação, supervisão e acompanhamento permanente de uma equipe de reprodução interinstitucional (Embrapa-Epamig) sediada em Juiz de Fora. Cada Laboratório poderá atender num raio em torno de 200

quilômetros. A Embrapa Milho e Sorgo participaria também nos treinamentos para a produção de alimentos volumosos e manejo nutricional do rebanho, a serem ministrados aos produtores engajados no programa.

O Laboratório existente na Embrapa Gado de Leite, por possuir infra-estrutura suficiente e vir obtendo resultados promissores, deve tornar-se um laboratório piloto ou de referência. Uma vez disponibilizada economicamente a biotecnologia, esse laboratório serviria de modelo para a implantação de uma rede de laboratórios semelhantes nas principais bacias leiteiras do Estado, que poderá contar com a parceria da iniciativa privada, secretarias municipais de agricultura, sindicatos rurais, cooperativas etc., conforme interesse já demonstrado.

É importante frisar que tais laboratórios terão como finalidade principal a produção maciça de embriões F1 (meio-sangue) em razão da grande demanda por esse tipo de animal pelos produtores do Estado, o que não impede, entretanto, o atendimento a produtores com rebanhos puros (Holandês, Pardo-Suíço, Jersey, Zebuínos etc.).

## Equipe técnica

A equipe técnica atualmente existente nas duas instituições parceiras (Embrapa/Epamig) não é suficiente ou adequada para atender aos objetivos e programação descritos. Por esse motivo e em razão da importância do Programa, a Embrapa Gado de Leite, que já conta com três pesquisadores (doutores) na área em questão, recentemente (nov./2001) contratou mais um pesquisador para se integrar à equipe. Em contrapartida, conforme estipulado no Convênio assinado entre as partes, caberá à Epamig disponibilizar dois médicos-veterinários recém-doutores, com treinamento específico na área de Reprodução (Biotecnologia-Embriologia) e Biologia Molecular, para se integrarem à equipe de reprodução da Embrapa Gado de Leite, constituindo uma equipe interinstitucional, somando esforços para um objetivo comum.

## **Conclusões finais**

Concluiu-se que todas as etapas de produção in vitro de embriões bovinos (coleta de ovócitos, MIV, FIV, CIV, taxa de gestação) precisam ter sua eficiência melhorada, mas especificamente para gado de leite dois pontos de estrangulamento são fundamentais: a sexagem de espermatozóides e a eficiência na criopreservação de embriões PIV.



---

***Gado de Leite***

*Coordenação:*

Embrapa Gado de Leite  
Epamig

*Apoio:*

Embrapa Milho e Sorgo  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Uenf  
UFF  
Unesp Jaboticabal  
Vitrogen