

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Orientadora: Daniela dos Santos Brum

Daniele Missio

Uruguaiana, julho de 2015.

DANIELE MISSIO

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM
MEDICINA VETERINÁRIA**

Relatório do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguiana, da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Daniela dos Santos Brum
Médica Veterinária, Msc, Dr^a.

**Uruguiana
2015**

DANIELE MISSIO

Relatório do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguaiana, da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Biotecnologia da Reprodução

Relatório apresentado e defendido em 08 de julho de 2015.

Prof^a. Dr^a. Daniela dos Santos Brum
Orientador

Prof. Dr. Fábio Gallas Leivas
Medicina Veterinária/Universidade Federal do Pampa -UNIPAMPA

Prof. Dr. Fabrício Denconsi Mozzaquatro
Medicina Veterinária/Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Dedico esta conquista aos meus pais, Valdecir e Rosane, meus maiores exemplos e que sempre acreditaram e apoiaram a realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre iluminando meus passos e meus caminhos. Dando conforto nos momentos de dificuldade e apoiando nos momentos de vitória.

Aos meus pais, Valdecir e Rosane, e minha irmã, Daiane que sempre apoiaram e compreenderam os muitos momentos de ausência. Agradeço por estarem sempre do meu lado, com palavras de apoio e incentivo, pelo amor e carinho.

Aos meus queridos mestres de graduação, em especial a Dra. Daniela dos Santos Brum e o Dr. Fábio Gallas Leivas, por serem mais que orientadores e também amigos, por acreditarem em mim, me incentivarem e abrirem meus olhos para o conhecimento.

Aos alunos da graduação e mestrado do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução e do grupo PET Veterinária, da UNIPAMPA, por toda a amizade e carinho nestes cinco anos e por terem contribuído com minha formação: Antônio, Cecília, Gabriela, Giovane, Hirya, Karine, Marcelo, Natalia, Natan, Rodrigo, Tainã.

Aos meus colegas e todos os amigos que de uma forma ou outra, foram importantes durante minha trajetória acadêmica e nessa etapa final, especialmente Dirvano e Natan, obrigada por tudo.

Aos amigos que conheci na EMBRAPA/CENARGEN, que tiveram paciência e dedicação para que eu pudesse aprender e treinar durante a realização do estágio: Dra. Margot, Ana Luiza, Andrielle, Felipe, Anelise, Sarah, José Felipe, José Carvalho, Ligiane, Severino, Luzia, Thiago, João, Luiz Manoel, Venâncio, obrigada pela atenção e apoio oferecidos.

Graças ao amor, carinho e paciência de vocês consegui concluir uma importante etapa da minha vida!

Muito obrigada à todos!

*“Ando devagar porque já tive pressa
e levo esse sorriso, porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei, eu nada sei
Conhecer as manhas e as manhãs,
o sabor das massas e das maçãs,
é preciso amor pra poder pulsar,
é preciso paz pra poder sorrir,
é preciso a chuva para florir.
Penso que cumprir a vida seja simplesmente
compreender a marcha, e ir tocando em frente
como um velho boiadeiro levando a boiada,
eu vou tocando os dias pela longa estrada eu vou,
de estrada eu sou
Todo mundo ama um dia, todo mundo chora,
Um dia a gente chega, no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história,
e cada ser em si, carrega o dom de ser capaz,
e ser feliz...”*

(Almir Sater e Renato Teixeira)

ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA- ÁREA DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO

O presente relatório descreve as principais atividades acompanhadas e desenvolvidas durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV) realizado na área de biotecnologia da reprodução. Durante o ECSMV, foi possível acompanhar técnicas reprodutivas utilizadas atualmente em bovinos, como *ovum pick up*, produção *in vitro* e transferência de embriões, clonagem por transferência nuclear e ultrassonografia aplicada à reprodução. Como local de estágio optou-se pela unidade do Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) na cidade de Brasília, DF. O estágio curricular supervisionado foi realizado sob supervisão da pesquisadora Doutora Margot Alves Nunes Dode e orientação da professora Doutora Daniela dos Santos Brum, entre os dias 23 de fevereiro e 05 de junho de 2015, perfazendo um total de 600 horas.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1:	Classificação morfológica dos complexos <i>cumulus</i> -ovócitos bovinos.....	21
Figura 1:	Rastreio e seleção de ovócitos bovinos destinados à maturação <i>in vitro</i>	21
Figura 2:	Classificação embrionária conforme o estágio de desenvolvimento. A- Mórula; B- Mórula compacta; C-Blastocisto inicial; D-Blastocisto; E- Blastocisto expandido; F-Blastocisto em eclosão; G-Blastocisto eclodido.....	25
Figura 3:	Protocolo de superovulação (SOV) realizado em doadoras de embriões.....	27
Figura 4:	Coleta de embriões bovinos. A: Esquema do método não cirúrgico de coleta em sistema fechado. B: Coleta de embriões em D14.....	28
Figura 5:	Esquema da vitrificação e aquecimento de embriões bovinos. A: Vitrificação de embriões. SM- Solução de Manutenção; SV1- Solução de Equilíbrio; SV2- Solução de Vitrificação. B: Aquecimento de Embriões. SA1- Solução de aquecimento 1; DV2-Solução de aquecimento 2.....	32
Figura 6:	Ovócito maturo e desnudo utilizado para a realização da enucleação e reconstrução.....	35
Figura 7:	Desenho esquemática da distribuição das organelas citoplasmáticas durante a maturação, fecundação e formação dos zigotos bovinos. A- Progressão da maturação nuclear e redistribuição das organelas citoplasmáticas da fase de vesícula germinativa para o estágio de metáfise II e formação do zigoto. B-Distribuição das organelas e a liberação do conteúdo dos grânulos corticais após a liberação de cálcio intracelular (Ca^{2+}), após a penetração do espermatozoide no ovócito durante a fecundação.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas no Laboratório de Reprodução Animal I durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.....	18
Tabela 2	Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas no Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem, durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.....	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	microlitro
ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes
AI	Anáfase I
BBGA	Banco Brasileiro de Germoplasma Animal
Be	Blastocisto eclodido
BE	Benzoato de Estradiol
Bi	Blastocisto inicial
Bl	Blastocisto
Bn	Blastocisto em eclosão
BSA	Albumina Sérica Bovina
Bx	Blastocisto expandido
Ca^{2+}	Cálcio
CCO	Complexo <i>cumulus</i> -ovócito
CENARGEN	Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia
CES	Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CL	Corpo Lúteo
CO_2	Dióxido de Carbono
CP	Corpúsculo Polar
CT	Centro de Treinamento
DMAP	Dimetilaminopurina
DMEN	<i>Dubelcco's Minimum Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECC	Escore de Condição Corporal

eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
ECSMV	Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária
EG	Etilenoglicol
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
GO	Goiás
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide
IETS	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
LAV	Meio de Lavagem
LH	Hormônio Luteinizante
LRA	Laboratório de Reprodução Animal
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mc	Mórula compacta
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mm	milímetro
Mo	Mórula
MOET	Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões
MPF	Fator Intracelular Promotor da Fase M
N ₂	Nitrogênio

N ₂ L	Nitrogênio Líquido
NaCL	Cloreto de Sódio
O ₂	Oxigênio
°C	Grau Celsius
OPU	<i>Ovum pick-up</i>
P4	Progesterona
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PHE	Penicilina, Hipotaurina e Epinefrina
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PVP	Polivinilpirrolidona
RA	Reação Acrossômica
SA	Solução de Aquecimento
SFB	Soro Fetal Bovino
SM	Solução de Manutenção
SOF	<i>Synthetic oviductal fluid</i>
SOV	Superovulação
SV	Solução de Vitrificação
TCM	<i>Tissue culture medium</i>
TE	Transferência de Embriões
TI	Telófase I
TN	Transferência Nuclear
UI	Unidade Internacional
UV	Ultravioleta
VGBD	<i>vesicle germinal break down</i>
ZP	Zona Pelúcida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	ATIVIDADES ACOMPANHADAS/DESENVOLVIDAS	18
2.1	Produção <i>in vitro</i> de embriões	20
2.1.1	Maturação <i>in vitro</i>	20
2.1.2	Fecundação <i>in vitro</i>	22
2.1.2.1	Seleção espermática.....	22
2.1.3	Desenvolvimento e cultivo embrionário <i>in vitro</i>	23
2.2	Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões (MOET)	26
2.2.1	Seleção de vacas doadoras e receptoras de embriões	26
2.2.2	Superovulação das doadoras.....	27
2.2.3	Coleta de embriões	28
2.2.4	Transferência de embriões.....	29
2.3	Criopreservação de embriões: Vitrificação	30
2.3.1	Vitrificação de embriões bovinos	30
2.3.2	Aquecimento de embriões bovinos	31
2.4	Clonagem por Transferência Nuclear.....	32
2.4.1	Maturação <i>in vitro</i>	33
2.4.2	Cultivo de células somáticas.....	33
2.4.3	Enucleação e reconstrução dos ovócitos	34
2.4.4	Ativação.....	35
2.4.5	Cultivo <i>in vitro</i> de embriões	36
3	DISCUSSÃO.....	37
3.1	Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	37
3.1.1	Maturação <i>in vitro</i>	38

3.1.2 Fecundação <i>in vitro</i>	41
3.1.2.1 Seleção espermática.....	42
3.1.3 Desenvolvimento e cultivo embrionário <i>in vitro</i>	44
3.2 Ovulações Múltiplas e Transferência de Embriões	45
3.2.1 Fisiologia do ciclo estral.....	45
3.2.2 Superovulação	46
3.2.3 Coleta de embriões	49
3.2.4 Inovulação de embriões.....	49
3.3 Vitrificação de embriões.....	50
3.3.1 Crioprotetores	51
3.3.2 Técnicas de vitrificação.....	52
3.3.2.1 <i>Cryotop</i>	53
3.3.3 Aquecimento.....	54
3.4 Clonagem por Transferência Nuclear.....	54
3.4.1 Maturação <i>in vitro</i>	55
3.4.2 Cultivo de células somáticas.....	56
3.4.3 Enucleação e reconstrução de ovócitos	56
3.4.4 Ativação.....	58
3.4.5 Cultivo <i>in vitro</i> de embriões	59
4 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXO A	74

1- INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com aproximadamente 206 milhões de cabeças (IBGE, 2010), onde cerca de 80% do rebanho é composto por animais de raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) e apenas a raça Nelore representa 90% dessa parcela (ABIEC, 2015). Nesse cenário as biotécnicas aplicadas à reprodução estão em plena ascensão no país, logo que podem contribuir enormemente com os programas de melhoramento animal (FRANCO e MELO, 2006). Entre as biotécnicas reprodutivas difundidas comercialmente no cenário nacional encontram-se a Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões (MOET) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE). A MOET representa uma excelente ferramenta de multiplicação de animais geneticamente superiores e ocupa em todo o mundo uma posição de destaque, já a PIVE apresenta resultados inconstantes, principalmente quanto à produção e qualidade embrionária. No entanto, apesar destes entraves, atualmente são produzidos mais de 450 mil embriões *in vitro* ao redor do mundo (STROUD, 2012), sendo o Brasil, em 2013, responsável pela produção de 366.510 desses embriões (VIANA e FIGUEIREDO, 2015). Conforme Pontes e colaboradores (2011), o sucesso da PIVE no Brasil advém do elevado número de ovócitos obtidos da aspiração folicular guiada por ultrassom (*ovum pick up*-OPU) em doadoras de raças zebuínas, principalmente da raça Nelore, permitindo assim a aplicação comercial em programas de larga escala. Porém, apesar da ascensão e do aumento na taxa embrionária conseguido com a PIVE nas últimas décadas, sua eficiência ainda é muito baixa, sendo a taxa máxima obtida de blastocistos raramente superior a 40% e com índices de gestação em torno, também, de 40% (NEVES et al., 2010). Além disso, outro fator limitante para a técnica é a alta sensibilidade dos embriões ao resfriamento e baixa tolerância à criopreservação em relação à produção *in vivo* (GEORGE et al., 2006). Conforme Enright e colaboradores (2000), os embriões produzidos *in vitro* (PIV) têm maior sensibilidade a crio injúrias em relação a embriões produzidos *in vivo*. Outra importante biotecnologia que ainda é pouco difundida no país é a clonagem por Transferência Nuclear (TN). A TN está sendo implantada e desenvolvida com os objetivos de modelo científico para diferentes estudos básicos, regeneração de raças/espécies em vias de extinção, melhoramento animal, e sem dúvida, com o objetivo de dar suporte à produção de animais transgênicos (RUMPF, 2007). A bezerra Vitória, produzida

em 2001, pela EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, foi o primeiro animal produzido a partir da transferência nuclear na América Latina e após 14 anos de seu nascimento, os resultados da clonagem ainda são insatisfatórios. A possível causa para a baixa eficiência da PIVE e da clonagem por TN são as etapas de reprogramação epigenética, principalmente no âmbito da clonagem (FERREIRA, 2013). Nas últimas décadas ocorreram avanços nas técnicas reprodutivas, os quais se originaram de pesquisas realizadas por empresas comerciais e instituições de ensino e pesquisa, como universidades e órgãos governamentais como a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

Fundada em 1973, a EMBRAPA possui 46 unidades distribuídas em 23 estados brasileiros e no Distrito Federal. Entre essas unidades, está o Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), situado na cidade de Brasília no Distrito Federal. Localizada a 15°50'16" de latitude sul e a 47°42'48" de longitude oeste, a uma altitude de 1000 a 1200 metros acima do nível do mar no chamado Planalto Central, Brasília possui uma população de aproximadamente 3 milhões de habitantes (IBGE, 2010). Com um relevo em sua maior parte plano, a capital federal tem uma vegetação típica do cerrado, com clima tropical com estação seca e temperaturas médias mensais superiores a 18°C e precipitação média de 1.540 mm anuais, concentrados entre os meses de outubro e abril. Em meio ao centro administrativo do país, a EMBRAPA/CENARGEN possui dois locais para o desenvolvimento de pesquisas voltadas às biotecnologias reprodutivas, o Laboratório de Reprodução Animal I (LRA I) e o Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem (CES), também chamado de "Fazenda Sucupira". O LRA I é destinado às pesquisas e atividades rotineiras da área laboratorial aplicadas às biotecnologias reprodutivas tais como PIVE, TN, transgenia, biologia molecular, criopreservação e coloração de espermatozoides, ovócitos e embriões, entre outras. Para isto, conta com uma infraestrutura composta pelos seguintes laboratórios: Laboratório de Genética molecular animal I e II, Laboratório de cultivo de células, Laboratório de Criobiologia, Laboratório de PIVE, Laboratório de Micromanipulação, além das salas de Lavagem e Esterilização de Materiais, de Preparo de Meios, de Fixação e uma sala para a estocagem de botijões criogênicos que contem uma câmara fria mantida a 10°C para o armazenamento dos meios utilizados no LRA-I. O CES possui uma área total de 1.763,118 ha e além de desenvolver suas pesquisas na área de biotecnologia, possui o setor de recursos genéticos com a conservação *in situ* e *ex situ* de espécies domésticas em risco de extinção. Fisicamente o CES é composto pelo Laboratório de Reprodução Animal (LRA-II), chamado de "Laboratório da Fêmea", no qual técnicas

como protocolos de inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e superovulação (SOV), OPU, PIV e transferência de embriões (TE) são realizadas. As biotécnicas relativas aos machos como, exame andrológico, coleta, envase e criopreservação de sêmen são realizados no Centro de Treinamento (CT), também denominado de Laboratório do Macho. No mesmo prédio funciona o Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA), responsável por pesquisas e pela conservação de material genético de diferentes espécies e raças de animais domésticos que podem estar em risco de extinção (conservação *ex situ*). Outro setor do CES é composto por um capril e uma granja de suínos com baias separadas por categoria e sexo, com balança, um aprisco e piquetes de pastagens.

A escolha do local para a realização do estágio curricular supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV) foi motivado pela excelência em pesquisas que a EMBRAPA/CENARGEN realiza e pelo interesse pessoal na área científica e de biotécnicas reprodutivas, contribuindo dessa forma com a minha formação. Assim, o objetivo deste relatório é apresentar as principais atividades desenvolvidas na EMBRAPA/CENARGEN com ênfase na produção *in vitro* de embriões, ovulações múltiplas seguidas por transferência de embriões, vitrificação de embriões e clonagem por transferência nuclear, realizadas durante ECSMV sob supervisão da Dra. Margot Alves Nunes Dode e orientação da Dra. Daniela dos Santos Brum no período de 23 de fevereiro a 05 de junho de 2015 totalizando uma carga horária de 600 horas.

2- ATIVIDADES ACOMPANHADAS/DESENVOLVIDAS

Durante o período de estágio pode-se acompanhar as principais atividades que tangem as biotécnicas reprodutivas aplicadas aos bovinos, como a PIVE, a clonagem por TN, métodos de avaliação e criopreservação de sêmen, ovócitos e embriões, ultrassonografia, OPU e Biologia Molecular. Todas as atividades estavam vinculadas a rotina do LRA-I e do CES e de projetos de pesquisa realizadas por alunos da pós-graduação (TABELA 1 e 2).

TABELA 1- Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas no Laboratório de Reprodução Animal I, durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.

Atividades	Número	%
Produção <i>in vitro</i> de Embriões Bovinos	15	16,9
Acompanhamento da Clonagem por Transferência Nuclear	12	13,5
Preparação de Soluções e Meios	11	12,4
Maturação de Ovócitos Suínos	10	11,2
Participação no <i>Journal Club</i>	8	9,0
Lavagem e Esterilização de Materiais	5	5,6
Avaliação da Cinética de Maturação Ovocitária	5	5,6
Treinamento no Citômetro de Fluxo	4	4,5
Coloração de Embriões Bovinos	4	4,5
Acompanhamento das Técnicas de Biologia Molecular	4	4,5
Biópsia de Ovócitos Imaturos	3	3,4
Vitrificação de Embriões Bovinos	2	2,2
Avaliação Espermática em Sistema Computadorizado	2	2,2
Avaliação da Integridade de Membrana Plasmática e Acrossoma de Espermatozoides	2	2,2
Sexagem de Embriões Bovinos	1	1,1
Participação em Defesas de Mestrado	1	1,1
Total	89	100,0

TABELA 2: Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas no Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem, durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária

Atividades	Número	%
Ultrassonografia em Bovinos	434	42,8
Coleta de Sangue em Bovinos	326	32,1
Protocolo de Sincronização de Estro, IATF e Superovulação	67	6,6
Aplicação de Vacinas para Raiva e Febre Aftosa	46	4,5
Coleta de Embriões Bovinos	26	2,6
Exame Ginecológico em Ovelhas	22	2,2
Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos	16	1,6
Coleta de Embriões Suínos	10	1,0
Ultrassonografia em Ovelhas	9	0,9
Aspiração Folicular guiada por Ultrassom em Bovinos	9	0,9
Inseminação Artificial em Bovinos	9	0,9
Diagnóstico de Gestação em Bovinos	8	0,8
Inovulação de Embriões Bovinos	8	0,8
Seleção de Vacas Doadoras e Receptoras de Embriões	6	0,6
Produção <i>in vitro</i> de Embriões Bovinos	6	0,6
Vitrificação de Embriões Suínos	4	0,4
Atendimento Clínico em Bovinos e Ovinos	4	0,4
Vitrificação de Ovócitos Bovinos	3	0,3
Coleta e Congelamento de Sêmen Bovino	2	0,2
Total	1015	100,0

2.1 Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões (PIVE), consiste na maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos, fecundação *in vitro* (FIV) de ovócitos e cultivo *in vitro* (CIV) de embriões a partir de ovócitos imaturos até a fase de mórula ou blastocisto, quando os embriões podem ser transferidos às receptoras ou criopreservados.

2.1.1 Maturação *in vitro*

Os ovócitos utilizados para a PIVE e para a clonagem por TN em bovinos na EMBRAPA/CENARGEN durante o ECSMV foram obtidos de ovários coletados em um abatedouro localizado na cidade de Luziânia-GO. Foram utilizados ovários de fêmeas cruzadas (*Bos Indicus* x *Bos Taurus*) logo após o abate. O transporte dos ovários ao laboratório de FIV foi realizado em solução salina (0,9% de NaCl) suplementada com Penicilina G (100 UI/mL) e sulfato de estreptomicina (100 ug/mL) em temperatura média de 34°C em caixa isotérmica. Ao chegar ao laboratório, foram registradas a temperatura da solução salina e o horário do início e final da coleta dos ovários, sendo que o tempo entre o início da coleta dos ovários no abatedouro e o início da MIV não devia ser superior a seis horas.

No laboratório de FIV, os ovários foram lavados novamente em solução salina pré-aquecida a 32-36°C e os folículos com diâmetro entre 3 e 8 mm aspirados com uma agulha de 40x12mm acoplada a uma seringa de 10 ou 20 mL. O conteúdo aspirado foi depositado em tubos cônicos de 15 mL mantidos em banho-maria a 32-36°C. Após o preenchimento dos tubos com o líquido folicular contendo os complexos *cumulus*-ovócitos (CCOs) os tubos foram mantidos por 10 minutos para a sedimentação dos mesmos. Em seguida, 10 a 12 mL do sobrenadante foram transferidos, com o auxílio de uma pipeta sorológica, para um tubo

cônico estéril de 15 mL, e centrifugados por 5 minutos a 700 x g. O líquido folicular centrifugado foi depositado em placas de Petri (100x20mm), previamente riscadas, juntamente com o *pellet* contendo os CCOs a serem rastreados.

Os CCOs foram rastreados sob estereomicroscópio com aumento de 16X e depositados em uma placa de Petri (35x10mm) contendo 2-3 mL do líquido folicular centrifugado. Em seguida, os ovócitos rastreados foram classificados sob estereomicroscópio, com aumento de 50X (FIGURA 1) de acordo com a homogeneidade de seu citoplasma e o número de camadas das células do *cumulus*, conforme Stojkovic et al. (2001; QUADRO 1).

QUADRO 1- Classificação morfológica dos complexos *cumulus*-ovócitos bovinos

Categoria	CCO
1	COCs com citoplasma homogêneo e granulações finas; Múltiplas, completas e compactas camadas de células do <i>cumulus</i> .
2	Ooplasma com pequenas áreas com pigmentações irregulares; <i>Cumulus</i> compacto, menor que os ovócitos de grau 1, mas com pelo menos 5 camadas completas;
3	Citoplasma heterogêneo/vacuolizado <i>Cumulus</i> com ao menos três camadas de células e/ou com pequenas áreas desnudas;
4	Ovócito com citoplasma heterogeneamente pigmentado; <i>Cumulus</i> completamente/parcialmente ausente ou expandido.

Fonte: Adaptado de Stojkovic et al. (2001).



FIGURA 1-Rastreio e seleção de ovócitos bovinos destinados à maturação *in vitro*. Fonte: Arquivo Pessoal

Após a seleção dos ovócitos de grau 1 e 2, os mesmos foram lavados em uma gota de meio MIV (TCM-199 com sais de Earl's, suplementado com amicacina, soro fetal bovino, L-glutamina, hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante) e depositados em gotas do mesmo meio sob óleo siliconado, mantidos durante 22-24 horas em estufa a 39°C e 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. O volume e a quantidade de gotas a serem utilizadas para a PIVE variou de acordo com o número de ovócitos e foram iguais durante a MIV, FIV e CIV.

2.1.2 Fecundação *in vitro*

A fecundação é um processo complexo resultado da união do ovócito com o espermatozoide, ela assinala o início da transição de ovócito para embrião, onde o ovócito é ativado e tem o material hereditário do pai introduzido em si mesmo (GORDON, 2003).

O meio utilizado para a FIV dos ovócitos maduros na EMBRAPA/CENARGEN é denominado FEC final, ele consiste no meio FERT-TALP acrescido de penicilamina, hipotaurina e epinefrina (PHE) e heparina. O mesmo foi preparado no dia da FIV e estabilizado por no mínimo 2 horas a 39°C e 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

A preparação dos ovócitos a serem fecundados, consistiu na retirada dos mesmos da gota de maturação e lavagem em uma gota de FEC final. Em seguida os ovócitos foram depositados em gotas de FEC final, sob óleo siliconado e mantidos na estufa a 39°C e 5% de CO₂ em ar até o momento da inseminação.

2.1.2.1 Seleção espermática

Para a realização da FIV, além da preparação dos ovócitos é necessária a realização da seleção espermática. Na EMBRAPA/CENARGEN preconiza-se para a seleção o gradiente descontínuo de Percoll, sendo que durante o estágio foi utilizado o mini-Percoll 90 e 45%. Para a realização do mesmo, em um microtubo, foram adicionados 400 μL de Percoll a 90% e sobre ele o mesmo volume do Percoll 45%.

O sêmen congelado utilizado para a FIV era proveniente de um touro *Bos indicus* com fertilidade comprovada. Para a seleção o sêmen foi descongelado a 36°C por 30 segundos. Uma alíquota do mesmo foi colocada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas, e avaliada quanto à motilidade e vigor em microscópio óptico com aumento de 100X. A amostra apenas foi submetida ao gradiente descontínuo de mini-Percoll quando apresentasse motilidade $\geq 30\%$ e vigor ≥ 2 . Para o método de gradiente de Percoll, o sêmen foi depositado sobre o gradiente previamente aquecidos e centrifugado por 5 minutos a 700 x g (9000 rpm). Em seguida, o *pellet* formado foi resuspenso em 1 mL de meio sp-TALP e centrifugado novamente por 5 minutos a 700 x g. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi removido e adicionado ao *pellet* até 100 μL do meio FEC final. Posteriormente, retirou-se duas alíquotas de 5 μL , uma para a avaliação da motilidade e do vigor após a passagem pelo gradiente de Percoll e outra para a realização da diluição para a concentração espermática, a qual foi realizada em Câmara de Neubauer.

Com a seleção espermática realizada, fez-se o cálculo da dose inseminante, sendo a concentração final/gota ajustada de modo a alcançar a concentração final equivalente a 1×10^6 espermatozoides/mL. Em seguida, os ovócitos foram inseminados sobre estereomicroscópio e co-incubados com os espermatozoides por 18 a 20 horas a 39°C e 5% de CO_2 em ar e umidade saturada. O dia da FIV foi considerado o dia 0 (D0) do desenvolvimento embrionário.

2.1.3 Desenvolvimento e cultivo embrionário *in vitro*

Na EMBRAPA/CENARGEN 18 a 20 horas após a FIV, os possíveis zigotos foram levemente pipetados para leve desnudamento e lavados em 2 ou 3 gotas de fluido sintético de oviduto (SOF) suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais, sódio tri citrato, myo-inositol e soro fetal bovino (SOFaaci; HOLM et al., 1998), sendo em seguida

transferidos para gotas contendo o mesmo meio, sob óleo siliconado e mantidos em estufa a 39°C, com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

Os embriões foram avaliados sob estereomicroscópio quanto a clivagem em D2 (48 horas após a FIV) e em D6, D7 e D8 para as taxas de blastocistos. As avaliações realizadas em diferentes dias do CIV possuíam como objetivo prever a viabilidade do embrião, através do seu correto estágio de desenvolvimento e de sua morfologia. De acordo com o estágio de desenvolvimento os embriões receberam diferentes denominações e conforme o Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), elaborado por Stringfellow e Givens (2010) foram classificados nos seguintes estágios (FIGURA 2):

- **Mórula (Mo):** é possível distinguir individualmente os blastômeros e sua massa ocupa quase todo o espaço perivitelino. A massa embrionária possui no mínimo 16 células.

- **Mórula compacta (Mc):** D5-D6, possui aproximadamente 32-64 blastômeros. Seus blastômeros estão unidos e constituem uma massa compacta que ocupa de 60-70% do espaço perivitelino, sendo a compactação considerada com um dos sinais da diferenciação embrionária embora os blastômeros conservem sua capacidade totipotente.

- **Blastocisto inicial (Bi):** D7, possui 100-200 células. Caracteriza-se pelo começo do transporte do fluido das células trofoectodérmicas e pela formação da blastocele no interior do embrião. O Bi ocupa de 70-80% do espaço perivitelino, sendo possível diferenciar o trofoblasto da massa celular interna.

- **Blastocisto (Bl):** D7-D8, contêm 100-200 células. Existe uma evidente diferenciação entre as células do trofoblasto e a massa celular interna (disco embrionário) mais escura. A blastocele é evidente e o embrião ocupa a maior parte do espaço perivitelino, nesta fase, também é possível a diferenciação visual da massa celular interna e do trofoblasto.

- **Blastocisto expandido (Bx):** D7-D8, o embrião contém mais de 200 células, nesse ponto o diâmetro aumenta consideravelmente com o consequente adelgaçamento da zona pelúcida (ZP), que chega a atingir um terço de sua espessura inicial. A pressão crescente do blastocisto em crescimento provoca a ruptura da ZP, através da qual ocorre a eclosão.

- **Blastocisto eclodido (Be):** D8-D9, com 200-800 células, os embriões são liberados da ZP. Podendo estar parcialmente fora da ZP (blastocisto em eclosão- Bn) ou totalmente eclodidos. Embriões nesta fase são extremamente frágeis.

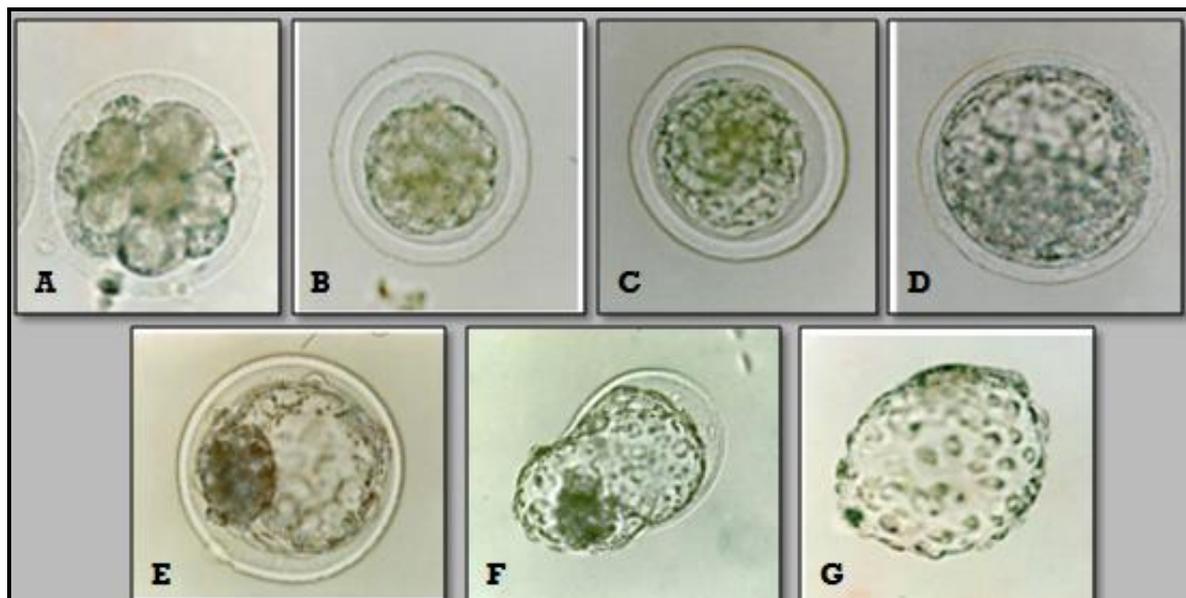


FIGURA 2: Classificação embrionária conforme o estágio de desenvolvimento. A- Mórula; B- Mórula compacta; C-Blastocisto inicial; D-Blastocisto; E-Blastocisto expandido; F- Blastocisto em eclosão; G- Blastocisto eclodido. Fonte: Adaptado de Bó e Mapletoft (2013).

Além do estágio de desenvolvimento, outro ponto extremamente importante é a morfologia do embrião. Conforme Stringfellow e Givens (2010), um embrião ideal deve ser esférico e compacto. Os blastômeros devem ter tamanho, cor e textura similar. O citoplasma não deve apresentar vesículas ou granulações. O espaço perivitelino deve ser claro e não conter debris celulares. A ZP deve ser uniforme, não sendo colapsada ou contendo debris em sua superfície. Assim, o conceito de qualidade embrionária pode variar de 1-4 e são descritos abaixo:

- **Grau I:** excelente ou bom. Os embriões têm uma massa esférica e simétrica e com blastômeros individuais que são uniformes em tamanho, cor e densidade. Este embrião é consistente com o estado de desenvolvimento esperado. Irregularidades devem ser relativamente menores, e, ao menos, 85% da massa celular deve estar viável. Este julgamento deve basear-se na porcentagem de células embrionárias representados pela material extruso no espaço perivitelino. A ZP deve ser lisa e não ter superfícies côncavas que podem causar a aderência do embrião na Placa de Petri ou nas palhetas. Embriões de grau I resistem bem ao congelamento/descongelamento e são chamados de “embriões congeláveis”, além de serem os recomendados para o comércio internacional.

- **Grau II:** Regular. Estes embriões têm moderada irregularidade na forma global da massa embrionária ou em tamanho, cor e densidade das células individuais. Pelo menos 50% da massa embrionária deve estar intacta. A resistência destes embriões ao congelamento/descongelamento é inferior aos embriões de Grau I, mas as taxas de prenhez

são adequadas se os embriões são transferidos frescos às receptoras. Portanto, esses embriões são frequentemente chamados de "transferíveis", mas não "congeláveis".

• **Grau III:** Pobre. Estes embriões têm mais irregularidades no formato da massa embrionária ou em tamanho, cor e densidade dos blastômeros. Ao menos 25% da massa embrionária deve estar intacta. Estes embriões não resistem ao congelamento/descongelamento. As taxas de prenhez são inferiores as obtidas com embriões de Grau II se transferidos a fresco às receptoras.

• **Grau IV:** Morto ou degenerado. Estes podem ser embriões, ovócitos ou embriões com uma célula. Eles não são viáveis e devem ser descartados.

Durante o ECSMV, o LRA-I produziu 295 blastocistos (23,89%) no D7, porém os embriões produzidos a partir da PIV não foram utilizados para a transferência a fresco ou criopreservados. De acordo com as pesquisas desenvolvidas, os embriões foram congelados para expressão gênica ou corados para a contagem do número de células.

2.2 Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões (MOET)

A MOET (do inglês, *multiple ovulation and embryo transfer*) é um processo que permite recolher embriões de uma fêmea doadora e transferi-los para fêmeas receptoras que serão responsáveis por gestá-los. A MOET pode ser caracterizada por três etapas: indução da superestimulação ovariana ou superovulação (SOV) da doadora; coleta, identificação e classificação dos embriões e transferência para a receptora.

2.2.1 Seleção de vacas doadoras e receptoras de embriões

A seleção das vacas a serem doadoras e receptoras, durante o ECSMV, foi realizada através do escore de condição corporal (ECC) que deveria ser superior a 3, em uma escala de 1 a 5, das condições do trato reprodutivo da fêmea e de sua ciclicidade, sendo esta avaliada com auxílio da ultrassonografia.

2.2.2 Superovulação das doadoras

Para a produção *in vivo* de embriões, as doadoras foram superestimuladas através de protocolos de SOV e conseqüentemente inseminadas em tempo fixo. A emergência da onda folicular foi sincronizada através da administração intramuscular de benzoato de estradiol (BE) e inserção de dispositivo intravaginal de progesterona (P4) em D0. Entre D4 e D7 realizou-se um tratamento superestimulatório com Hormônio Folículo Estimulante (FSH), o qual foi aplicado 160 mg em doses decrescentes, duas vezes ao dia, totalizando oito aplicações. Em D6 foi administrada Prostaglandina F2 α (PGF2 α), a fim de realizar a luteólise do corpo lúteo (CL) do ciclo anterior. Na sétima aplicação de FSH (D7), realizou-se a remoção do implante de progesterona. Após 12 horas da aplicação da última dose de FSH foi administrada via intramuscular uma dose de Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH). A IATF foi realizada 12 e 24 horas após a utilização do GnRH, utilizando sêmen congelado *Bos indicus*. A coleta dos embriões foi realizada 16 dias após o início do protocolo de superestimulação ou em D7 do desenvolvimento embrionário (FIGURA 3).

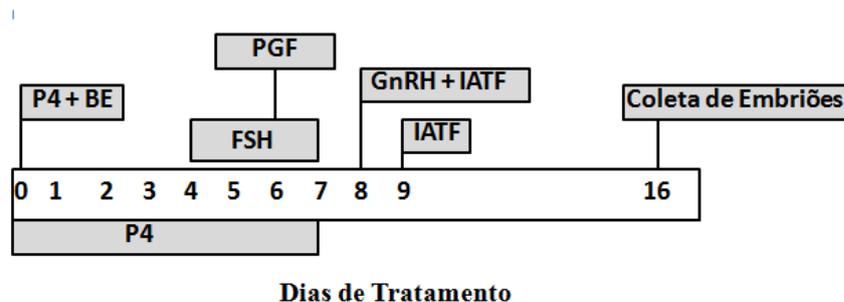


FIGURA 3: Protocolo de superovulação (SOV) realizado em doadoras de embriões. Fonte: Arquivo Pessoal.

2.2.3 Coleta de embriões

Em D7 de desenvolvimento embrionário, realizou-se a coleta de embriões nas vacas doadoras. Antes de iniciar a coleta propriamente dita, realizava-se a ultrassonografia nos animais para visualizar o número de CL nos ovários.

A coleta de embriões foi realizada através do método não cirúrgico em sistema fechado (FIGURA 4A) após o prévio processo de contenção física, anestesia epidural realizada com o uso de lidocaína a 2% e antisepsia da região perianal. Guiado por palpação retal, foi inserido o dilatador cervical na vagina, sendo em seguida o mesmo removido e inserido a sonda de Foley de duas vias com auxílio de um mandril de aço inoxidável. O balão da sonda foi inflado com 3 a 5 mL de PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*) e o mandril removido. Após, foi conectado na sonda um equipo em Y, sendo uma das extremidades conectada ao PBS aquecido a 37°C e a outra ao copo coletor com filtro. Por gravidade, 1 a 2L da solução de PBS fixada acima na altura da cabeça do técnico, foram utilizados para lavagem uterina por infusão e sifonagem, manipulada através de palpação retal. Após a lavagem uterina, o balão da sonda era desinflado e a mesma retirada e lavada com o PBS do sistema dentro do copo coletor. Em seguida, o filtro era removido do equipo e encaminhado ao laboratório.

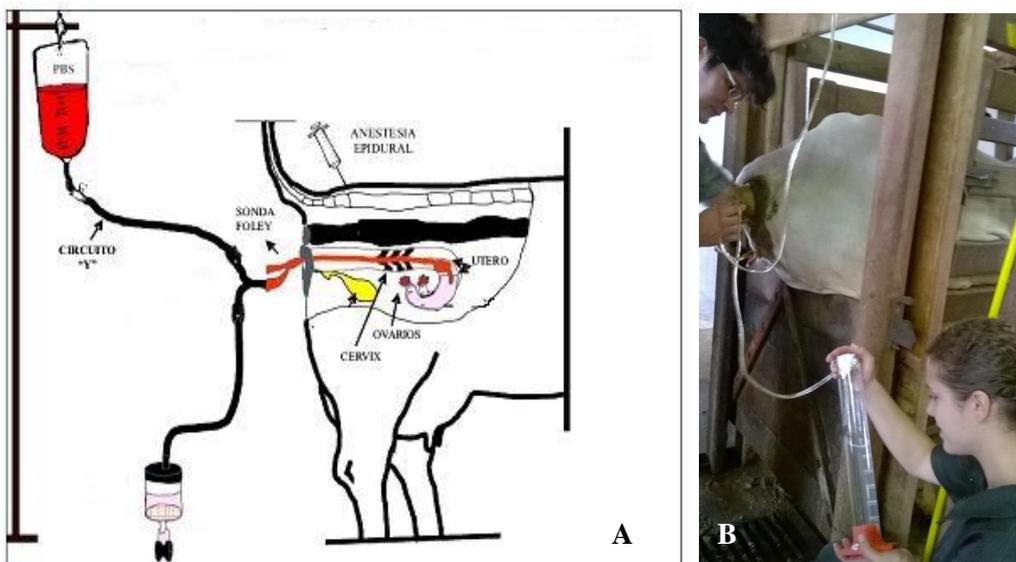


FIGURA 4: Coleta de embriões bovinos. A: Esquema do método não cirúrgico de coleta em sistema fechado. Fonte: Adaptado de Fernandez et al. (2015). B: Coleta de embriões em D14. Fonte: Arquivo Pessoal.

No laboratório o filtro foi lavado com PBS aquecido e o conteúdo do mesmo depositado em uma placa de Petri (100x20mm), previamente riscada. Os embriões foram rastreados sob estereomicroscópio com aumento de 20X e colocados em uma placa de Petri (35x10mm) contendo meio de manutenção pré-aquecido. Em seguida, os embriões foram classificados quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade, como recomendado pela IETS e descrito anteriormente. De acordo, com os parâmetros de classificação, os embriões foram envasados em palhetas para transferência imediata ou congelados a -20°C em RNA *Later* para posteriormente ser realizada a expressão gênica. Para o envase, os embriões em estágio de Bi, Bl e Bx foram lavados em gotas de PBS contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e transferidos para gotas de meio de manutenção, sendo em seguida envasados nas palhetas, de modo que a coluna central de meio de manutenção contendo os embriões encontrasse separada das colunas das extremidades por uma bolha de ar de cada lado.

Em todas as vacas doadoras, se realizou o sistema de coleta de embriões e ao final do procedimento foi realizada a administração de $\text{PGF2}\alpha$ nos animais.

2.2.4 Transferência de embriões

As receptoras utilizadas para a TE foram previamente sincronizadas, sendo o protocolo iniciado no dia anterior ao início do protocolo das doadoras. O protocolo consistiu da administração de BE e inserção do dispositivo de P4 intravaginal em D0. Em D8 foi administrada uma dose de $\text{PGF2}\alpha$ e removido o implante de P4. Em D9 aplicou-se uma dose de BE e no D17 foi feita a TE.

Antes do procedimento de inovulação dos embriões foi realizada a ultrassonografia, a fim de verificar em qual ovário se localizava o CL. A TE propriamente dita, também chamada de inovulação, foi realizada após anestesia epidural e antissepsia da região perineal da receptora. Auxiliado por palpação retal, a cérvix foi transpassada pelo inovulador e o embrião depositado na porção média do corno uterino ipsilateral ao ovário em que o CL estava presente.

O procedimento de MOET acompanhado durante o ECSMV fazia parte de um experimento para coleta de embriões com 14 dias de desenvolvimento. Assim, os mesmos após inovulação em D7 foram coletados em D14, sendo que as únicas diferenças no procedimento de coleta foram à adição de SFB ao PBS e a substituição do filtro pela proveta (FIGURA 4B).

2.3 Criopreservação de embriões: Vitrificação

A criopreservação de embriões tem se tornado uma parte integrante das biotécnicas reprodutivas nos animais domésticos. Com o intuito de manter o metabolismo celular em estado quiescente a criopreservação permite a conservação de tecidos e/ou células por tempo indeterminado. Conforme Gonçalves e colaboradores (2008) há três métodos de criopreservação: o método de congelamento convencional (lento, rápido, procedimento *one-step* e *multiple-step*), o método de congelamento ultrarrápido e a vitrificação. Durante o ECSMV acompanhou-se a técnica de vitrificação para o congelamento de embriões bovinos.

A vitrificação é um processo termodinâmico, no qual um fluido incrementa sua viscosidade durante o resfriamento, adquirindo propriedades de um sólido (BAUTISTA e KANAGAWA, 1998). Na EMBRAPA/CENARGEN o método de vitrificação utilizado foi o *cryotop*. Tal técnica consiste na utilização de uma haste de polipropileno na qual os embriões são alocados junto a volumes mínimos de solução de crioprotetor (DODE et al., 2013).

A vitrificação de embriões bovinos acompanhadas durante o ECSMV foi realizada durante o treinamento de uma aluna de pós-graduação, utilizando para isso, embriões descartados após CIV no LRA-I.

2.3.1 Vitrificação de embriões bovinos

Para a realização da vitrificação foram utilizadas três soluções, as quais foram mantidas a temperatura ambiente:

- Solução de Manutenção (SM) - composta por TCM199 Hank's com 20% de SFB;
- Solução de equilíbrio (SV1) - constituída pela SM + 7,5% de etilenoglicol (EG) +7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO)
- Solução de vitrificação (SV2) - composta por SM + 15% de EG + 15% de DMSO + 0,5 M de sacarose.

As manipulações realizadas para a vitrificação foram conduzidas sobre placa aquecedora mantida a 37°C e utilizando estereomicroscópio. Após a remoção dos blastocistos das gotas de cultivo, os mesmos foram alocados em grupos de cinco, em gotas contendo 70-80 µL de SM. Em seguida, os embriões foram submetidos a três banhos sequenciais na SV1, permanecendo em cada gota 3 minutos, totalizando 9 minutos na SV1. Após passarem pela solução de equilíbrio os embriões foram transferidos para a SV2, nessa, os embriões passaram por quatro banhos sequenciais, totalizando 60 segundos (FIGURA 5A).

Os embriões então foram colocados nas hastes de vitrificação com auxílio de uma micropipeta de vidro. Imediatamente após a deposição dos embriões nas hastes, o excesso de solução foi removida, deixando apenas uma fina camada sobre os embriões e a haste submersa em nitrogênio líquido (N₂L).

2.3.2 Aquecimento de embriões bovinos

Assim como na vitrificação, para o aquecimento dos embriões bovinos foram utilizadas três soluções.

- Solução de Manutenção (SM) - composta por TCM199 Hank's com 20% de SFB;
- Solução de Aquecimento 1 (SA1) - constituída de SM + 1M de sacarose;
- Solução de Aquecimento 2 (SA2) - composta de SM + 0,5 M de sacarose.

Com exceção da SA1, aquecida a 37°C, as demais soluções foram mantidas em temperatura ambiente. O aquecido foi realizado sob estereomicroscópio e toda a manipulação realizada sobre placa aquecedora. No aquecimento, as hastes contendo os embriões foram retiradas do N₂L com auxílio de uma pinça anatômica e a extremidade da haste com os

embriões foi imersa na gota contendo SA1. As estruturas permaneceram nesta gota por um minuto e posteriormente foram transferidos para a gota com SA2, na qual os embriões permaneceram por três minutos. Em seguida, os embriões foram submetidos a duas lavagens em SM, permanecendo por cinco minutos em cada gota (FIGURA 5B).

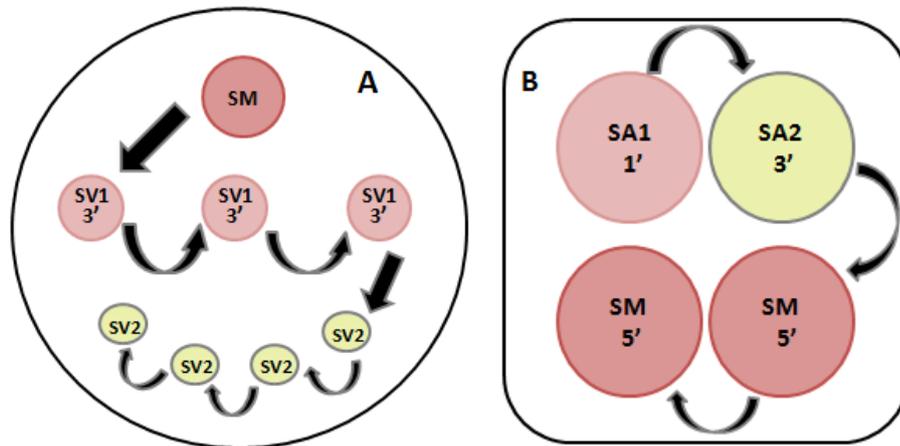


FIGURA 5- Esquema da vitrificação e aquecimento de embriões bovinos. A: Vitrificação de embriões. SM- Solução de Manutenção; SV1- Solução de Equilíbrio; SV2- Solução de Vitrificação. B: Aquecimento de embriões. SA1- Solução de aquecimento 1; DV2- Solução de aquecimento 2.

Como a vitrificação/aquecimento de embriões bovinos acompanhadas durante o ECSMV faziam parte de treinamento, logo após o mesmo, os embriões foram descartados.

2.4 Clonagem por Transferência Nuclear

A clonagem por transferência nuclear se baseia na substituição da cromatina de um ovócito maturado, ou seja, no estágio que estaria apto a ser fecundado, pelo núcleo de uma célula retirada do animal a ser clonado (BORDIGNON, 2008). A clonagem pode ser dividida na maturação dos ovócitos receptores, enucleação ou remoção da cromatina dos ovócitos receptores, preparação e transferência das células doadoras de núcleo e fusão dessas com os ovócitos receptores, ativação dos ovócitos receptores, cultivo e transferência dos embriões reconstituídos para fêmeas receptoras (GONÇALVES et al., 2008).

2.4.1 Maturação *in vitro*

Durante a realização do ECSMV, assim como na PIVE, a clonagem por transferência nuclear (TN) utilizou ovócitos a partir de ovários coletados em abatedouro. A metodologia empregada na maturação ovocitária foi semelhante a utilizada na PIVE e descrita no item 2.1.1, com a ressalva que para a MIV na clonagem por TN utilizou-se apenas CCOs grau 1 e a mesma teve duração de 20 horas.

Após a MIV os ovócitos foram desnudados utilizando hialuronidase, para isso, os ovócitos foram incubados a 39°C por cinco minutos com a enzima pré-aquecida. Posteriormente, os gametas foram transferidos para uma gota de LAV (TCM 199 com sais de Hank's + amicacina + SFB) e com pipetagens leves os ovócitos foram completamente desnudados sob estereomicroscópio. Após o desnudamento, se observou a presença do corpúsculo polar (CP), caracterizando assim ovócitos maturados. Apenas ovócitos com CP e totalmente desnudos foram utilizados para a TN. Após a seleção dos ovócitos, os gametas foram incubados por 30 minutos com SOF acrescido de citocalasina D e Hoechst 33342.

2.4.2 Cultivo de células somáticas

Durante o ECSMV na EMBRAPA/CENARGEN as células utilizadas como doadoras de núcleos foram fibroblastos provenientes de biópsia da cauda de um touro Nelore, mantidas em cultivo em meio *Dubelcco's Minimum Eagle Medium* (DMEM) suplementado com bicarbonato de sódio, piruvato, SFB e antibióticos em garrafas de 25 cm² e mantidas a 39°C e 5 % de CO₂ em ar e umidade saturada.

No dia da enucleação e reconstrução dos ovócitos, as células a serem utilizadas deviam estar confluentes. Para a preparação das células, todo o sobrenadante de meio DMEM

foi removido das garrafas. Em seguida, adicionou-se 1 mL de tripsina na garrafa por cinco minutos a 39°C. Posteriormente, o conteúdo das garrafas foi transferido para microtubos onde se adicionou 500 µL de meio DMEM e centrifugou por 5 minutos a 200 x g. Após a centrifugação, o *pellet* formado foi resuspendido em 1 mL de meio DMEM. Para a manipulação das células para TN 20 µL dessa suspensão foi adicionada a 500 µL de LAV acrescido de Albumina Sérica Bovina (BSA). No momento da micromanipulação as células a serem utilizadas, foram depositadas em grupos nas gotas de LAV + BSA montadas na placa de micromanipulação sob óleo mineral.

2.4.3 Enucleação e reconstrução dos ovócitos

Após os ovócitos maduros serem incubados em SOF + citocalasina D + Hoesch 33342 por 30 minutos, os mesmos foram transferidos para gotas contendo LAV sob óleo mineral e levados ao micromanipulador. Os ovócitos foram fixados individualmente na pipeta holding e posicionados de forma que o CP permaneça-se na posição de 4 a 6 horas (FIGURA 8). O CP e uma porção do citoplasma adjacente a ele foram retirados com auxílio da pipeta de aspiração, evitando que a ZP fosse rompida. Após cada enucleação, foi observado se a placa metafásica e o CP haviam sido removidos, através da incisão de luz ultravioleta (UV) sobre o material removido.



FIGURA 6- Ovócito maduro e desnudo utilizado para a realização da enucleação e reconstrução. Fonte: Laboratório de Reprodução Animal I (LRAI).

Na sequência, realizou-se a reconstrução, através do mesmo orifício aberto na ZP durante a enucleação, um fibroblasto foi depositado no espaço perivitelino. As estruturas reconstruídas foram transferidas para uma placa de quatro poços contendo LAV. Após a reconstrução, as estruturas foram submetidas ao processo de eletrofusão. Para a fusão a câmara de fusão foi montada utilizando 1 mL de D-manitol aquecido. Em grupos de 5 ovócitos, os embriões foram depositados sobre a câmara de fusão, tendo o cuidado de deixar as células e o citoplasma do ovócito alinhados paralelamente. A fusão foi realizada através da geração de dois pulsos elétricos com carga de 2,1kVA/cm, voltagem de 80 V e 30 a 50 μ s de duração. Em seguida, os embriões foram transferidos para outro poço contendo LAV e mantidos por 30 minutos em estufa a 39°C, 5% CO₂ em ar, para ocorrer a fusão.

2.4.4 Ativação

Para a ativação, as estruturas fusionadas foram transferidas e incubadas por 5 minutos em solução SOF contendo ionomicina, a fim de ocorrer a retomada da meiose a partir do

influxo de cálcio. Em seguida, as estruturas foram transferidas e mantidas por 4 horas em solução SOF contendo 6-dimetilaminopurina (DMAP).

2.4.5 Cultivo *in vitro* de embriões

Após a ativação com ionomicina e 6-DMAP, as estruturas foram cocultivadas por 7 dias em meio SOFaaci, sob monocamada de células do *cumulus*. As células do *cumulus* utilizadas para a formação da monocamada foram preparadas no dia anterior ao início do CIV. Para isso, utilizaram-se ovócitos descartes, os quais foram desnudos em meio LAV e as células do *cumulus* centrifugadas a 200 x g por cinco minutos. Em seguida o sobrenadante foi removido e as células resuspendidas em meio SOFaaci. Para cada gota, contendo 200 µL de meio SOF a ser utilizada no CIV utilizou-se 7 µL de células centrifugadas. Posteriormente, as placas contendo as gotas de CIV com as células do *cumulus*, sob óleo siliconado, foram mantidas em estufa a 39°C e 5% de CO₂ em ar.

Os embriões foram avaliados quanto ao seu desenvolvimento com 48 horas de cultivo (D2) para verificação da clivagem, e em D7 e D8 para a formação de blastocistos. Todo o procedimento de clonagem por TN era anotado em fichas de avaliação.

Após o cultivo, os embriões clones utilizados em experimentos foram descartados, enquanto os embriões produzidos na rotina do laboratório foram transferidos à receptoras no dia D7, conforme descrito na transferência de embriões anteriormente.

3- DISCUSSÃO

3.1 Produção *in vitro* de embriões bovinos

A PIVE é uma biotécnica da reprodução assistida que permite a realização de um grande número de pesquisas envolvendo maturação e fecundação de ovócitos, capacitação espermática e desenvolvimento embrionário até sua fase de implantação (GONÇALVES et al., 2008).

Em 1935 registrou-se a primeira evidência do nascimento de coelhos resultantes do cultivo *in vitro* de embriões, porém apenas na década de 1950 tem se relatos do surgimento de um animal gerado a partir da FIV (GONÇALVES et al., 2008). Em bovinos, no final dos anos 1970 ocorreu a primeira descrição de FIV e em 1982 o nascimento do primeiro bezerro oriundo dessa técnica (BRACKETT et al, 1982). Já em 1987 ocorreu o nascimento do primeiro bezerro totalmente produzido *in vitro*, desde a maturação do ovócito até o cultivo do embrião (LU et al., 1987). No Brasil a técnica de PIVE vem sendo realizada desde o início dos anos 1990, com as primeiras confirmações de gestação em 1993 (OLIVEIRA et al., 1994).

A PIVE permite a otimização e multiplicação de fêmeas de interesse comercial ou em perigo de extinção, o aumento de crias de uma única fêmea, a utilização de bezerras pré-púberes, vacas em início de gestação, com subfertilidade e senis além de auxiliar ao estabelecimento de técnicas como a clonagem por TN, a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) e a transgenia (RUMPF, 2007). Porém o desenvolvimento de ovócitos bovinos imaturos até blastocistos a partir da PIVE é cerca de 40%, sendo que aproximadamente 90% dos ovócitos imaturos atingem a maturação nuclear e cerca de 80% deles são fecundados e clivam (LONERGAN et al., 2003). Assim, a PIVE além de apresentar inconsistência de resultados, possui como desvantagens o custo inicial para a construção da infraestrutura e o tempo consumido para executar a rotina (GONÇALVES et al., 2008). Portanto, estudos sobre PIVE são imprescindíveis, pois só assim será possível indicar

modificações e melhorar os protocolos para que o sistema *in vitro* possa chegar o mais próximo possível do sistema *in vivo* (DODE, 2006).

3.1.1 Maturação *in vitro*

Os ovócitos localizam-se dentro de folículos ovarianos e são formados durante a fase fetal das fêmeas mamíferas. O número de folículos é variável de acordo com a espécie e raça dos animais. Em bovinos, foi estimada que a população folicular para *Bos taurus* é ao redor de 130 mil (ERICKSON, 1966), enquanto para *Bos indicus* esse número é de 70.500 folículos (LUCCI et al., 2002), sendo que durante toda a vida, a fêmea utilizará apenas 0,01% dessa reserva folicular (ERICKSON, 1966).

Os ovócitos utilizados na PIVE bovinos podem ser obtidos *in vivo* através da OPU, laparotomia ou laparoscopia ou *ex vivo* por meio de dissecação ou aspiração folicular de ovários coletados em abatedouros, como realizado na EMBRAPA/CENARGEN. A utilização de ovócitos, oriundos de abatedouros, apesar de aumentar o número de descendentes de doadoras que morreram, possui limitações, como o tempo de transporte do matadouro ao laboratório, o desconhecimento acerca do estado de saúde e do padrão hormonal e, principalmente, a impossibilidade de repetição da técnica para um mesmo animal (SENEDA et al., 2002).

A recuperação de ovócitos por aspiração de folículos antrais usando seringa e agulha ou bomba de vácuo tem sido os métodos comumente utilizados com ovários bovinos provenientes de abatedouros (GORDON, 2003), sendo preconizada na EMBRAPA/CENARGEN a utilização de seringa e agulha, logo que a taxa de recuperação é superior, entretanto esse método possui como desvantagem a velocidade de aspiração, que é mais lento (GORDON, 2003). Um ponto bastante questionado é o efeito do diâmetro folicular sobre a competência ovocitária, ou seja, a habilidade do ovócito de passar pela maturação, ser fecundado e desenvolver uma gestação a termo. Conforme Blondin e Sirard (1995), o

tamanho do folículo é um importante fator na seleção de ovócitos, os mesmos autores sugerem que folículos com diâmetro menor que 3 mm não desenvolvem até o estágio de mórula. Ainda, conforme Gonçalves e colaboradores (2008), folículos menores geralmente não são competentes para a retomada da meiose e folículos maiores que 8 mm estão em processo de atresia ou de maturação, estando em ambos os casos a viabilidade dos ovócitos comprometida. Considerando estes fatores, na EMBRAPA/CENARGEN realiza-se a aspiração de folículos com 3 a 8 mm de diâmetro. Além do diâmetro folicular a morfologia dos COCs é um dos parâmetros mais utilizados e conhecidos para selecionar os ovócitos com maior competência (CAIXETA e DODE, 2010). Normalmente ovócitos classificados como de melhor qualidade apresentam-se completamente rodeados, três camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo (ZEUNER et al., 2003). Conforme Nagano e colaboradores (2006) a qualidade das células do *cumulus* é essencial, pois elas fornecem ao ovócito carboidratos, aminoácidos e nucleotídeos que são essenciais para a maturação citoplasmática. Além disso, sua correta expansão na maturação é importante para o transporte do CCO no oviduto e união com o espermatozoide para a fecundação. Ainda, conforme Nagano e colaboradores (2006), ovócitos com citoplasma amarronzado homogêneo apresentam uma alta taxa de fecundação, clivagem e blastocistos em relação ao citoplasma escuro e pálido.

A maturação ovocitária se refere ao estágio final da preparação do ovócito para ser fecundado, e envolve modificações nucleares e citoplasmáticas. Durante todo o período de crescimento do ovócito e de desenvolvimento folicular, os ovócitos ficam retidos em estágio de diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica (ADONA, 2011). *In vivo*, a maturação ovocitária tem seu início com o pico preovulatorio de LH (GONÇALVES et al., 2008), enquanto que *in vitro* essa maturação inicia com a retirada do ovócito do folículo (EDWARDS, 1965; GONÇALVES et al., 2008), por serem privados de substâncias inibitórias presentes no líquido folicular (SIRARD et al., 2006). A maturação nuclear e citoplasmática ocorrem simultaneamente *in vivo* e de forma assincrônica *in vitro* (HUANG et al., 1999), isso é sugerido, pois conforme Caixeta e Dode (2010), apenas 25-40% dos ovócitos maturados *in vitro* são competentes para o desenvolvimento até o estágio de blastocisto, enquanto que *in vivo* estas taxas são de 60-80%, estando associado principalmente ao status da maturação citoplasmática que difere entre competentes e incompetentes (SIRARD et al., 2006).

A maturação nuclear se refere à retomada do primeiro bloqueio meiótico e a progressão até metáfase II (MII; MINGOTI, 2000). A maturação nuclear requer de 18 a 22

horas (GONÇALVES et al., 2008) e é caracterizada pelo rompimento da vesícula germinativa (VGBD, do inglês, *vesicle germinal break down*), reorganização da rede de microtúbulos, condensação e alinhamento equatorial dos cromossomos, marcando o final da prófase I e progressão pelos estádios de metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase (TI), completando a primeira divisão meiótica, passando rapidamente para metáfase da segunda divisão meiótica (MII) que culmina com a divisão dos cromossomos homólogos e liberação do CP, havendo um novo bloqueio no ciclo celular até a fecundação (SIRARD, 2001). Conforme Wu e colaboradores (1996), a cinética da maturação nuclear transcorrida em cada fase da maturação de ovócitos bovinos tem duração de 10,3 a 15,4 horas na MI, de 15,4 a 16,6 horas em AI, de 16,6 a 18 horas em TI e de 18 a 24 horas em MII.

A maturação citoplasmática refere-se a modificações moleculares e no número, tamanho e/ou na posição das organelas (GONÇALVES et al., 2008). Entre estas mudanças ocorre a condensação do nucléolo, redistribuição de organelas como mitocôndrias e ribossomos, a redução do aparelho de Golgi, aumento do conteúdo de lipídios e alinhamento dos grânulos corticais próximos a membrana plasmática (SIRARD et al., 2006), conforme a FIGURA 7.

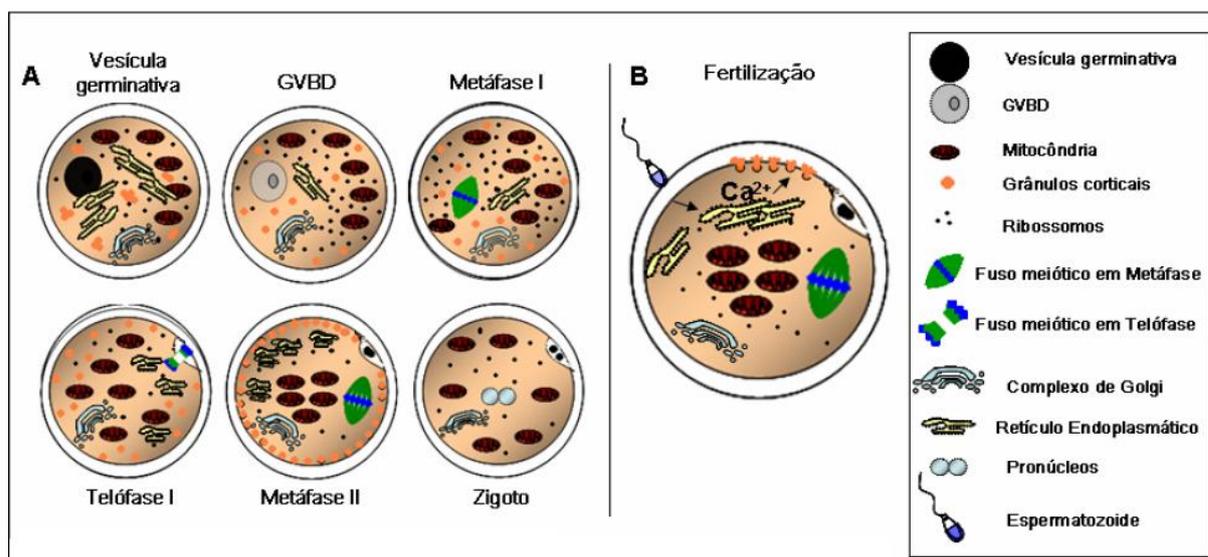


FIGURA 7- Desenho esquemático da distribuição das organelas citoplasmáticas durante a maturação, fecundação e formação dos zigotos bovinos. A- Progressão da maturação nuclear e redistribuição das organelas citoplasmáticas da fase de vesícula germinativa para o estágio de metáfase II e formação do zigoto. B- Distribuição das organelas e a liberação do conteúdo dos grânulos corticais após a liberação de cálcio intracelular (Ca^{2+}), após a penetração do espermatozoide no ovócito durante a fecundação. Fonte: Adaptado de Ferreira et al., 2009.

Os meios de cultivo utilizados também são importantes para a correta maturação dos ovócitos. Assim como na EMBRAPA/CENARGEN, a grande maioria dos laboratórios tem utilizado o *Tissue Culture Medium* (TCM-199) como meio de MIV de ovócitos bovinos (VARAGO et al., 2008). Outros meios podem ser utilizados, como o SOF, sendo que o mesmo é capaz de promover a maturação ovocitária na ausência de macromoléculas (LONERGAN et al., 2004). De acordo com o protocolo de cada laboratório o meio pode ser tamponado com bicarbonato ou HEPES e suplementado com vários soros e/ou gonodotrofinas e/ou hormônios esteróides, fonte de energia (glicose e piruvato); fonte proteica (SFB e BSA) e antioxidantes. Conforme Gonçalves e colaboradores (2008) a maioria dos resultados demonstra que a adição de gonodotrofinas ao meio de maturação de ovócitos bovinos melhora o posterior desenvolvimento embrionário. Além disso, a suplementação do meio com fontes proteicas de origem animal tem apresentado os melhores resultados na maturação ovocitária e no desenvolvimento dos embriões (CAROLAN et al., 1995). Estudos mostram que a adição de SFB é um dos requisitos para alcançar a perfeita expansão das células do *cumulus* e a maturação do ovócito (GONÇALVES et al., 2008), porém meios contendo SFB ou BSA não apresentam formulação definida e possuem componentes como fatores de crescimento, aminoácidos e proteínas que variam significativamente entre diferentes partidas e fornecedores (McKIERNAM et al., 1992).

O tempo de MIV na EMBRAPA/CENARGEN é de 22-24 horas, pois se sabe que ovócitos maturados por mais tempo apresentaram considerável redução no desenvolvimento embrionário, comprovando o efeito prejudicial do envelhecimento ovocitário sobre as taxas de produção embrionária (GORDON, 2003). Além disso, deve se ressaltar que quando a maturação ovocitária é inadequada, a mesma inviabiliza a fecundação e aumenta a ocorrência de polispermia, de partenogênese e de bloqueio do desenvolvimento embrionário (MINGOTI, 2000).

3.1.2 Fecundação *in vitro*

A fecundação é um processo complexo, resultado da união do ovócito com o espermatozoide, ela assinala o início da transição de ovócito para embrião. Para a fecundação do ovócito, o espermatozoide precisa de motilidade para se aproximar do gameta, sofrer o processo de capacitação e a conseqüente reação acrossômica (RA). A capacitação é o processo pelo qual o espermatozoide obtém potencial fecundante e consiste na reorganização de proteínas e lipídios da membrana plasmática, alterações nas características de motilidade e mudanças na atividade metabólica que culminam com a RA. *In vivo*, esta capacitação ocorre durante a passagem do espermatozoide pelo trato reprodutivo da fêmea, já *in vitro*, vários métodos foram testados para a indução da capacitação, sendo que a utilização da heparina se mostrou o método mais eficiente (VARAGO et al., 2008). Com o propósito de aumentar a atividade espermática e facilitar a penetração no ovócito se faz uso do PHE no meio FERT-TALP (GONÇALVES et al., 2008), pois se sabe que a penicilamina associada a epinefrina aumenta a porcentagem de espermatozoides que sofrem a RA e que a hipotaurina aumenta a motilidade espermática, e quando associada a epinefrina incrementa as taxas de penetração do espermatozoide no ovócito (GORDON, 2003), sendo utilizados na EMBRAPA/CENARGEN tanto a heparina quanto o PHE, no meio de fecundação.

Quanto a concentração espermática e o tempo de coincubação de ovócitos e espermatozoides a ser utilizada para a FIV em bovinos, estudos sugerem que 1 e 2×10^6 espermatozóides/mL são mais adequados para manter uma boa taxa de clivagem sem aumentar a taxa de poliespermia (DIAS et al., 2006). E a coincubação dos ovócitos e espermatozóides pode variar de 6 a 24 horas de acordo com os protocolos utilizados pelos laboratórios (GARCIA et al., 2005; MINGOTI, 2000), sendo utilizado durante o estágio a dose inseminate de 1×10^6 espermatozoides/mL e uma coincubação de 18-20 horas. A fecundação *in vitro* é um processo dependente de temperatura (LENZ et al., 1983), sendo que os melhores resultados são obtidos quando o processo ocorre em temperatura de 39°C, com atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (GORDON, 2003; MINGOTI, 2000; GONÇALVES et al., 2008;).

3.1.2.1 Seleção espermática

Considerando que a maioria dos laboratórios utiliza sêmen congelado para a FIV, após o descongelamento deve-se realizar a seleção espermática a fim de aumentar a porcentagem de espermatozoides móveis e/ou normais utilizados na FIV (PARRISH, 1995), além de remover componentes do diluidor, debris celulares e agentes infecciosos (HENKEL e SCHILL, 2013). Existem vários métodos para a seleção espermática, como o gradiente contínuo ou descontínuo de Percoll, a filtragem em coluna de gel de Sephadex, a migração ascendente (*swim up*) e lavagens por centrifugação (HENKEL e SCHILL, 2013), sendo o gradiente descontínuo de Percoll e o *swim-up* os mais utilizados. Conforme Gonçalves e colaboradores (2008), o método de separação deve ser rápida, simples, de baixo custo, capaz de recuperar a maioria dos espermatozoides móveis, não resultar em alterações espermáticas, remover espermatozoides mortos, debris celulares e substâncias tóxicas e assim usar os melhores espermatozoides disponíveis a partir de amostras de sêmen congelado/descongelado (DODE et al., 2002).

No *swim up* os espermatozoides vivos são separados dos mortos, do plasma seminal e dos componentes dos diluidores por motilidade ascendente, sendo utilizado nesse processo o sp-TALP (tyrodes, albumina, lactato e piruvato). O Percoll é uma solução de sílica coloidal, com uma osmolaridade de 275-285mOsm e uma densidade de 1,123g/mL e um pH fisiológico (PALMA, 2001). A seleção com gradiente de Percoll possui duas vantagens em relação a outros métodos, a separação da maioria dos espermatozoides móveis (CESARI et al., 2006) e a rapidez em sua execução. Quando os espermatozoides móveis são rapidamente removidos do plasma seminal, células somáticas e espermatozoides mortos e/ou com morfologia anormal, os gametas são protegidos do estresse causado pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) que reduzem a fertilidade espermática (GORDON, 2003). Porém estudo realizado por Cesari e colaboradores (2006) constatou que espermatozoides selecionados com o Percoll possuem maior perda de acrossoma, provavelmente devido à endotoxinas da polivinilpirolidona (PVP) presente no colóide. Já a técnica de *swim up* não apresenta risco de toxicidade algum, porém possui dificuldade de repetibilidade, particularmente nos iniciantes (PALMA, 2001). Quanto a recuperação espermática e PIVE, o Percoll possui taxas de recuperação espermática superiores ao *swim up*, porém não se observa diferenças na capacidade de desenvolvimento embrionário (PARRISH et al., 1995). Além disso, estudos realizados por Dode e colaboradores (2002), utilizando o *swim up* e gradientes de Percoll não observaram diferença entre as técnicas sobre as taxas de penetração *in vitro*, formação de pronúcleo, polispermia e clivagem, porém estudos realizados por Cesari e colaboradores

(2006) sugerem taxas de embriões superiores com a utilização do Percoll para a seleção espermática. Em síntese, o gradiente de Percoll atende a maior parte dos quesitos de uma técnica eficaz para seleção espermática, e, além disso, resulta em frações límpidas, com espermatozoides de alta motilidade, reduz significativamente as EROS, não causa lesões na cromatina e elimina leucócitos. Considerando esses fatores, sugere-se a utilização do Percoll para o uso na rotina de PIVE em bovinos (PARRISH et al., 1995; CESARI et al., 2006), logo que permite um melhor aproveitamento de uma dose de sêmen. Durante o estágio na EMBRAPA/CENARGEN o protocolo para a seleção espermática foi o gradiente descontínuo de Percoll 90 e 45%, sendo o protocolo variável em laboratórios principalmente quanto ao tempo e força de centrifugação, número e volume de gradientes utilizados.

3.1.3 Desenvolvimento e cultivo embrionário *in vitro*

A partir da penetração do espermatozoide na ZP, a segunda divisão meiótica se completa e os cromossomos são envolvidos por uma membrana nuclear, formando o pronúcleo feminino. Concomitantemente, a membrana nuclear espermática se desintegra, a cromatina nuclear descondensa e ocorre a formação de uma nova membrana nuclear, formando o pronúcleo masculino. A migração dos pronúcleos para o centro do citoplasma do ovócito, onde ocorre a singamia e formação de um núcleo diplóide originará um novo indivíduo (GONÇALVES et al., 2008). Consequentemente, inicia-se o desenvolvimento embrionário por sucessivas divisões e alterações morfológicas para a formação de mórulas e blastocistos (YANAGIMACHI, 1994). Em média até D8, o desenvolvimento ocorre dentro da ZP e nos primeiros seis dias o embrião possui apenas aumento de tamanho e do número de blastômeros (PALMA, 2001). A partir do quinto dia após a FIV os embriões, que até então estavam apenas dividindo aumentam o número de células e passam a ter um número de blastômeros maior. Durante o cultivo embrionário até D9 ocorre momentos importantes, que incluem a clivagem, a ativação do genoma embrionário na fase 8-16 células (MEMILI e FIRST, 2000), compactação da mórula no dia 5 (BONI et al., 1999) e formação de blastocistos nos dias 6-7 de desenvolvimento, envolvendo a diferenciação em dois tipos

celulares o trofoblasto e a massa celular interna, sendo evidente que qualquer modificação no meio de cultura pode afetar qualquer um desses processos (LONERGAN et al., 2003).

No cultivo embrionário, é necessário o uso de meio simples que suporte a nutrição celular e o desenvolvimento durante a fase pré-implantação (GONÇALVES et al, 2008). Conforme PALMA (2001), atualmente os meios possuem dois aspectos básicos: desenvolver meios de cultivo que respondam as necessidades metabólicas dos embriões durante seu desenvolvimento e que evitem em sua composição diminuir ou eliminar suas fontes de proteína. Além disso, a suplementação dos meios de cultivo com aminoácidos em concentrações semelhantes as encontradas no oviduto e útero das fêmeas bovinas melhora a taxa de desenvolvimento embrionário e a inclusão de fontes proteicas (BSA ou SFB) nos meios de cultivo também favorece o desenvolvimento embrionário agindo como quelantes de cátions, prevenindo a adesão dos embriões na superfície, servindo como fonte de energia e auxiliando o metabolismo de carboidratos (THOMPSON, 2000). A fonte energética requerida para suprir as necessidades do embrião nas primeiras clivagens até 16-32 células é o lactato e o piruvato. Após a compactação e formação da blastocle, quando se inicia a diferenciação das células do embrião precisa de glicose (RIEGER *et al.*, 1992). Além disso, o cultivo embrionário pode ser realizado cultivando os embriões em grupo ou individualmente. Conforme Brum et al (2002), o cultivo ainda é realizado em grupos, estando associado a melhores taxas finais de blastocistos, pois segundo Blondin e Sirard (1995) é possível que ovócitos e embriões secretem ou metabolizem vários fatores em cada fase de cultivo que pode beneficiar os outros ovócitos/embriões, mas que quando cultivados individualmente esses fatores são diluídos ou não são secretados. Durante o ECSMV o cultivo embrionário foi realizado em grupos e cocultivo utilizando as células da granulosa.

3.2 Ovulações Múltiplas e Transferência de Embriões

3.2.1 Fisiologia do ciclo estral

O ciclo estral é definido como o período compreendido entre dois estros. Sabe-se que vacas são poliéstricas e apresentam estros regulares a cada 21 dias, podendo variar de 18 a 24 (HAFEZ, 2004). A fisiologia do ciclo estral é complexa e depende da perfeita interação entre diversos órgãos e sistemas corpóreos, fundamentados no sistema nervoso central, endócrino e reprodutivo sendo que a comunicação desses órgãos ocorre principalmente mediante os hormônios GnRH, LH, FSH, estradiol, P4 e PGF2 α .

O hipotálamo secreta GnRH de forma pulsátil até a hipófise onde liga-se aos receptores específicos para início da síntese e liberação, também pulsátil de FSH e LH. O FSH atua sobre o desenvolvimento, crescimento e maturação folicular, além de aumentar o número de receptores para o LH nas células da granulosa, sendo a seleção do folículo dominante associada à queda nas concentrações de FSH sanguíneo e aos receptores de LH, assim, folículos FSH dependentes entram em atresia (ADAMS, 2008). O LH é secretado de forma pulsátil e a frequência desses pulsos é regulada pelo GnRH, e conseqüentemente pela secreção de P4 pelo CL, durante a fase luteínica, pois através do mecanismo de *feedback negativo*, a P4 diminui a frequência de pulso de GnRH. Já a liberação de FSH é regulada pelo estrógeno produzido pelos folículos, o qual também é responsável por estimular a liberação de LH e conseqüente ovulação. No caso da fêmea não ter sido naturalmente coberta ou inseminada, posteriormente, o útero não recebe o sinal trofoblástico do embrião e libera prostaglandina que promove a lise do CL, por volta do 17º a 18º dia do ciclo, permitindo a ocorrência de um novo ciclo estral.

De forma geral, o ciclo estral pode ser dividido em duas fases: folicular e a luteínica, a primeira caracterizada pelo recrutamento, crescimento e maturação folicular, onde apenas um folículo irá ovular, nesta fase tem-se o pró-estro e estro e o hormônio predominante é o estradiol. A fase luteínica, caracterizada pelo metaestro e diestro, vai do momento da ovulação até a luteólise (HAFEZ, 2004).

3.2.2 Superovulação

Logo após o nascimento, os ovários de uma fêmea bovina contêm milhares de folículos, entretanto, poucos desenvolvem, maturam e ovulam durante a vida reprodutiva. Do grupo de folículos que iniciam a emergência da onda, um deles é selecionado, torna-se dominante e continua desenvolvendo, enquanto os outros regridem e tornam-se atrésicos (REICHENBACH et al., 2008). O aproveitamento mais racional desses folículos que se tornariam atrésicos pode ser obtido através da superovulação. Assim, define-se como superovulação o aumento do número fisiológico de ovulações para a espécie, provocado pela administração de gonadotrofinas (CABODEVILA e TORQUATI, 2001). O tratamento superovulatório objetiva suprir a deficiência da concentração de FSH antes que o folículo dominante promova a redução da concentração endógena dessa gonadotrofina. Assim, os efeitos da dominância folicular são neutralizados, a divergência impedida e o desenvolvimento simultâneo de vários folículos com características fisiológicas semelhantes daqueles selecionados para ovularem, torna-se possível (REICHENBACH et al., 2008).

A superovulação em bovinos pode ser obtida por protocolos, conforme a necessidade ou não da detecção de “estro base” da doadora, ou seja, aquele que ocorre antes do início do tratamento de SOV. Na EMBRAPA/CENARGEN o protocolo acompanhado foi sem a necessidade de detecção de estro. Assim o controle do ciclo é obtido basicamente pela aplicação de progestágenos empregados em dispositivos intravaginais ou implantes auriculares. Nesses protocolos a aplicação do implante ocorre em um dia aleatório do ciclo estral.

A variabilidade na resposta das doadoras ao tratamento superestimulatório com gonadotrofinas continua sendo um dos maiores problemas nos programas comerciais de TE (MAPLETOFT et al., 2002). Conforme Reichenbach et al. (2008), a alta variabilidade de resposta a terapia hormonal é decorrente de fatores relacionados ao meio ambiente, como nutrição, estabulações e temperatura ambiente dentre outros, bem como fatores inerentes a doadora como idade, raça, genética, sensibilidade ao estresse, ou ligados a gonadotrofinas e aos protocolos de superovulação. Mesmo com as doadoras mantidas em condições ideais, a ausência de resposta ao tratamento superovulatório ocorre em aproximadamente 20% dos animais, enquanto que apenas 30 ou 35% das doadoras conseguem obter o mínimo, seis embriões viáveis por colheita (REICHENBACH et al., 2008).

Quanto aos hormônios empregados, há diferentes relatos quanto a utilização de gonadotrofina coriônica equina (eCG) e FSH. Na maioria dos estudos comparando os dois métodos, o tratamento com FSH supera os resultados obtidos com o eCG (ROOVER et al., 2005). O eCG permite conseguir uma resposta superestimulatória com apenas uma dose, entre

o 8º e 12º dia do ciclo estral, porém por ter uma maior vida média no sangue, resulta em uma prolongada estimulação do crescimento folicular, provocando um crescimento disperso com altos níveis de estrógeno que afetam tanto as taxas de fertilidade quanto de qualidade embrionária (TAKEDOMI et al., 1995), assim quando usado, deve ser administrado nas doadoras soro anti-eCG (REICHENBACH et al., 2008). O FSH possui uma meia vida de aproximadamente 5-12 horas, sendo necessário realizar aplicações múltiplas para conseguir o efeito necessário nas fêmeas bovinas. Portanto, os protocolos mais comuns requerem seis a oito aplicações de FSH com intervalos de doze horas, a fim de que vários folículos se desenvolvam e possa ocorrer a ovulação múltipla, para permitir maior obtenção de embriões na coleta (FONSECA et al., 2001). Porém, como o FSH utilizado para o tratamento é oriundo do extrato de pituitária de suínos, ovinos e equinos (MARQUEZ et al., 2008), muitas vezes o mesmo possui grandes quantidades de LH, alterando os resultados da superovulação. Foi demonstrado que concentrações elevadas de LH em soluções de FSH possui efeitos negativos na produção e qualidade de embriões bovinos (BARROS e NOGUEIRA, 2004).

Conforme Reichenbach e colaboradores (2008), no terceiro ou quarto dia de tratamento com FSH, se faz necessária a utilização de um agente luteolítico visando reduzir o CL cíclico, sendo que podem ser administradas duas doses de PGF2 α com intervalo de 12 horas. Além disso, tem sido recomendado administrar BE no momento da aplicação do implante de P4, uma vez que essa combinação de tratamentos permite um controle maior do desenvolvimento folicular.

A SOV deve complementar-se com um regime ótimo de inseminação artificial, utilizando sêmen de ótima qualidade (CABODEVILA e TORQUATI, 2001). Existem dois esquemas básicos para a IA das fêmeas superovuladas, com detecção do estro ou IATF, sendo esta última metodologia utilizada na EMBRAPA/CENARGEN. Quando se observa a detecção de estro, o mesmo ocorre 48-72 horas após a administração de PGF2 α e as vacas deverão ser inseminadas 2 a 3 vezes durante o estro com intervalos de 8 a 12 horas. Na IATF é possível controlar o momento da ovulação, através da administração exógena de LH ou GnRH, pois a aplicação desses hormônios em protocolos de SOV possuem como objetivo apenas provocar o pico preovulatório de LH e assim produzir uma ovulação mais sincrônica (CABODEVILA e TORQUATI, 2001).

3.2.3 Coleta de embriões

Existem métodos cirúrgicos e não cirúrgicos de coleta de embriões, porém, há muito tempo o método não cirúrgico tem se tornado mais importante que o método cirúrgico para coleta de embriões (BETTERIDGE, 1980). A coleta de embriões normalmente é realizada entre o 6º e 8º dia após a primeira IA. Nesse período os embriões encontram-se flutuando em um filme líquido no lúmen da ponta dos cornos uterinos (REICHENBACH et al., 2008), permitindo assim, a sua captação através da técnica de lavagem dos cornos uterinos.

Existem dois métodos de coleta não cirúrgica, os sistemas aberto ou fechado (REICHENBACH et al., 2002), sendo realizado na EMBRAPA/CENARGEN o sistema fechado. Com o sistema fechado é mais fácil manter a esterilidade do processo e há menor chance de perda de meio e, conseqüentemente, de embriões. No sistema fechado, é acoplado à sonda um cateter em forma de Y, onde o meio de lavagem (PBS suplementado com SFB e antibióticos), é acoplado em uma via e o filtro de embrião acoplado na outra. O fluxo de ambas as vias é controlado por grampos de rápida liberação. Enquanto a via de saída do útero para o filtro é ocluída, o meio de lavagem entra no útero por gravidade com o frasco de meio suspenso há aproximadamente 1 metro do nível do útero. Abre-se o grampo de saída para permitir a retirada do fluido do útero e massageia-se gentilmente, por via retal, o corno uterino agitando o fluido para deslocamento do(s) embrião(ões) até o filtro. No sistema aberto, pouco utilizada no momento, são realizadas lavagens uterinas em frações de 40 a 50 mL de PBS com o auxílio de uma seringa acoplada diretamente à sonda de coleta. Este volume é infundido e recolhido novamente com a seringa (REICHENBACH et al., 2008). Após a coleta de embriões, é comum a administração de prostaglandina nas doadoras para regressão dos CLs, a fim de diminuir o tamanho dos ovários e interromper uma gestação indesejável caso algum embrião não tenha sido coletado.

3.2.4 Inovulação de embriões

A transferência de embriões, assim como a coleta, pode ser realizada de forma cirúrgica ou não cirúrgica, sendo a última mais utilizada atualmente (PALMA,2001) e usada na EMBRAPA/CENARGEN. Para a inovulação, somente embriões classificados com grau 1 a 3 devem ser utilizados, sendo os mesmos acomodados no centro de uma palheta contendo meio de cultivo. As receptoras deverão ser previamente sincronizadas, estando de forma sincrônica com as doadoras de embrião. Além disso, no dia da inovulação verifica-se a presença de CL e as características do mesmo (PALMA, 2001). Na inovulação, os embriões serão depositados no corno uterino ipsilateral ao ovário que ovulou, com auxílio de um inovulador, após anestesia e antissepsia perineal da receptora (PALMA, 2001).

3.3 Vitrificação de embriões

Atualmente, dois métodos são utilizados para a criopreservação de embriões, o congelamento lento ou clássico e a vitrificação. O congelamento clássico tem a vantagem de usar baixas concentrações de crioprotetores, entretanto permite a formação de cristais de gelo, que, em maior ou menor escala, resultarão em lesões às membranas e organelas (DODE et al., 2013). A vitrificação consiste em submeter os embriões a altas concentrações de crioprotetores com a finalidade de aumentar a viscosidade dos meios intra e extracelulares. Sendo assim, torna-se possível resfriar os embriões, passando-os do estado líquido ao estado vítrio sem a formação de cristais de gelo (KASAI et al., 1996; CABODEVILA e TERUEL, 2001; REICHENBACH et al., 2008). Este fenômeno ocorre pelo aumento extremo de viscosidade associado a uma taxa rápida de resfriamento, baseado na desidratação do embrião através de sua breve exposição a soluções com altas concentrações de crioprotetores, seguida de imersão direta em N₂L (VAJTA, 2000).

A vitrificação possui como vantagens ser simples, rápida e pouco onerosa, logo que não necessita de equipamentos para congelamento (REICHENBACK et al., 2008). Além disso, o método é o mais indicado para embriões PIV e permite a sobrevivência e retomada do

desenvolvimento embrionário depois do aquecimento e a transferência para as receptoras pode ser realizada logo após o aquecimento (REICHENBACH *et al.*, 2008). Porém, além da vitrificação, não possibilitar a transferência direta de embriões a toxicidade dos crioprotetores utilizados no método é elevada e as células apenas podem ser expostas a essa solução por um período muito curto de tempo e/ou um volume mínimo de solução (VAJTA *et al.*, 1998). Assim, desde que a vitrificação começou a ser utilizada na embriologia de mamíferos (RALL e FAHY, 1985) o objetivo dos diferentes protocolos propostos visavam a redução no tempo de exposição, a associação de crioprotetores e o aumento da velocidade de resfriamento (REICHENBACH *et al.*, 2008). Além disso, conforme Reichenbach e colaboradores (2008), a vitrificação nem sempre permite alcançar resultados de gestação após o aquecimento, principalmente se utilizado embriões bovinos de classe 2 e 3 e assim não tem sido adotada em larga escala para programas comerciais de TE (VAJTA, 2000).

3.3.1 Crioprotetores

Crioprotetores são substâncias que agem protegendo as organelas e estabilizando membranas durante a estocagem de células ou embriões em N₂L e são utilizados principalmente para remover a água intracelular (DOBRINSKY *et al.*, 2002). Conforme Kasai e colaboradores (1996), bons crioprotetores devem apresentar alta solubilidade, baixa toxicidade e baixo peso molecular para facilitar a passagem pela membrana celular. Os crioprotetores podem ser divididos em apenas duas categorias: (a) intracelulares, os quais permeiam a membrana e atuam no interior da célula, como o DMSO, EG e glicerol; e, (b) extracelulares, que agem na membrana sem ultrapassá-la e reduzem a formação de gelo, facilitam a desidratação das células e protegem a membrana celular (NIEMANN, 1991), como a sacarose, frutose, trealose, polímeros de PVP e álcool polivinil (KASAI e MUKAIDA, 2004).

Entre os crioprotetores intracelulares o EG é mais utilizado em protocolos de criopreservação, logo que possui baixo peso molecular e toxicidade (ALI e SHELTON, 1993,

MARTINEZ e MATKOVIC, 1998). Considerando esses fatores, o EG possui uma rápida velocidade de penetração celular quando comparado a outros crioprotetores e permite sua associação com outros crioprotetores (VAJTA et al., 1998), como o DMSO.

O DMSO possui alto peso molecular, sendo utilizado na vitrificação por induzir facilmente o estágio vítreo e preservar a integridade de proteínas e das membranas lipídicas (ANCHOROGUY et al., 1991; WOOD et al., 1993). Porém, esse crioprotetor possui uma alta toxicidade.

Segundo SPRICIGO (2011), os crioprotetores extracelulares, assim chamados por não permearem as membranas celulares, são agentes de alto peso molecular, responsáveis por diminuir os efeitos osmóticos e tóxicos e promover a desidratação e consequente vitrificação intracelular regulando a quantidade de crioprotetor intracelular. São divididos em dois grupos: os polímeros e os sacarídeos. Os compostos mono ou dissacarídeos são os mais empregados nos diferentes métodos de vitrificação, pois são capazes de preservar a estrutura e a integridade funcional das membranas (SARAGUSTY et al., 2009; SARAGUSTY e ARAV, 2011). A sacarose tem o efeito adicional de proteção, pois este crioprotetor aumenta a desidratação celular nos embriões, reduzindo a quantidade de água no citoplasma e evitando a formação de cristais de gelo (RALL, 1987). Porém, Martinez e colaboradores (2002) demonstraram que altas concentrações de sacarose (0,5M) resultaram em baixas taxas de eclosão do embrião.

A combinação de diferentes crioprotetores é frequentemente utilizada para aumentar a viscosidade e reduzir o nível de toxicidade dos mesmos. Os efeitos deletérios das soluções de congelamento são minimizados pela seleção adequada e mistura criteriosa dos crioprotetores para cada tipo celular, além da redução do volume final, utilizado em cada técnica (MASSIP, 2001). Na EMBRAPA/CENARGEN para a vitrificação se utiliza para a associação de crioprotetores intracelulares o EG e o DMSO e como crioprotetor extracelular a sacarose.

3.3.2 Técnicas de vitrificação

Há varias técnicas de vitrificação para embriões bovinos e as mesmas podem ser classificadas em dois grupos: i) com contato direto com o N₂L, o qual pode fornecer risco de contaminação (FOUNTAIN et al., 1997); e, ii) sem contato direto com o N₂L. As principais técnicas utilizadas para a vitrificação de embriões bovinos são: grades de cobre de microscopia eletrônica (MARTINO et al., 1996), *open pulled straw* – OPS (VAJTA et al., 1998), *cryoloop* (LANE et al., 1999), micro gotas (PAPIS et al., 2000), grades de nylon (MATSUMOTO et al., 2001), sistema *hemi-straw* (VANDERZWALMEN et al., 2003) e *cryotop* (KUWAYAMA et al., 2005), sendo que o último tem recebido especial atenção, principalmente em humanos e utilizada na EMBRAPA/CENARGEN para a criopreservação de ovócitos e embriões.

3.3.2.1 *Cryotop*

O *cryotop* é uma haste de polipropileno em que os embriões são colocados em volumes mínimos de solução (KUWAYAMA et al., 2005). Além disso, o *cryotop* também é constituído por uma tampa plástica, que recobre a haste, impedindo o contato com o N₂L, favorecendo uma melhor assepsia do material vitrificado. Atualmente é o método de vitrificação mais utilizado para ovócitos (MORATO et al., 2008; ZHOU et al., 2010), pois utiliza volumes mínimos de crioprotetores. Inaba e colaboradores (2011) comparando embriões *in vivo* e PIV criopreservados com congelamento clássico e vitrificação em palheta e em *cryotop*, observaram que a taxa de eclosão às 48 horas é superior com a utilização do *cryotop* quando comparado aos outros métodos. Além disso, Morato e colaboradores (2010), ao avaliarem a taxa de eclosão após a vitrificação com *cryotop* de embriões PIV de D7 e D8 nos estágios de Bi, Bx e Be, observaram que os mais avançados no desenvolvimento tiveram melhor taxa de eclosão em relação aos menos desenvolvidos. Já, quanto a vitrificação de ovócitos os resultados obtidos com o *cryotop* são inconstantes (SPRICIGO, 2011), com médias de produção de blastocistos em torno dos 5%, sendo que estudos realizados por Zhou

e colaboradores (2010) apresentaram taxas de produção de blastocisto em torno de 11% utilizando essa técnica.

3.3.3 Aquecimento

O aquecimento é o processo inverso, onde, a célula deve ser reidratada e os crioprotetores removidos do interior das células. A sacarose é comumente associada aos meios de aquecimento agindo como um tampão osmótico, mantendo constante a concentração do meio extracelular, regulando a velocidade de entrada e saída do crioprotetor no embrião e evitando o choque osmótico (LEIBO, 2008). Assim, como em muitos laboratórios, a EMBRAPA/CENARGEN utiliza para o aquecimento a sacarose.

3.4 Clonagem por Transferência Nuclear

A clonagem por TN atualmente é a técnica de eleição para a produção de animais idênticos (ALBERIO e ZAKHARTCHENKO, 2001). Essa técnica se baseia na substituição da cromatina de um ovócito maturo, ou seja, no estágio que estaria apto a ser fecundado, pelo núcleo de uma célula retirada do animal a ser clonado (BORDIGNON, 2008). Conforme Alberio e Zakhartchenko (2001), a utilização da clonagem promete ser uma técnica que contribuirá de maneira substancial ao desenvolvimento de biotecnologias, produção animal, preservação de espécies em risco de extinção e investigação básica. Segundo Campbell e colaboradores (2007) a frequência de desenvolvimento de clones não aumentou drasticamente desde o início da técnica, no entanto, modificações e melhorias nos protocolos têm causado uma série de efeitos dependendo da espécie, como:(1) a simplificação da metodologia, (2)

redução dos custos, e (3) melhor sobrevivência dos clones após o nascimento. Porém, apesar dos avanços dos conhecimentos, aprimoramento dos métodos e o incremento técnico a eficiência da transferência nuclear continua bastante limitada, onde um dos problemas observados na maioria dos estudos realizados é a elevada taxa de mortalidade embrionária e fetal (BORDIGNON 2008).

3.4.1 Maturação *in vitro*

Assim, como na PIVE, os ovócitos receptores podem ser obtidos a partir da superovulação de fêmeas doadoras (*in vivo*) ou pela maturação *in vitro* de ovócitos obtidos por punção folicular ou de ovários de abatedouro (ALBERIO e ZAKHARTCHENKO, 2001), sendo utilizado esse último método na EMBRAPA/CENARGEN durante o estágio supervisionado. Conforme Campbell e colaboradores (2007), o uso de ovócitos maturados *in vitro* apresenta uma série de vantagens quando comparado àqueles maturados *in vivo*, pois tem sido demonstrada uma variedade de fatores que interferem negativamente sobre a qualidade de ovócitos maturados *in vivo*, dentre os quais podem ser citados a idade da doadora e o protocolo de SOV (CAMPBELL et al., 2007). Além disso, ovócitos maturados *in vitro* a partir de ovários coletados em abatedouros resultam em baixo custo e em significativa quantidade de ovócitos e possibilita um maior controle dos estágios da maturação (PEREIRA e FREITAS, 2009).

Segundo BORDIGNON (2008), os ovócitos receptores representam um dos principais componentes da produção de embriões por TN, pois contem os fatores responsáveis pela reprogramação nuclear. Portanto a qualidade dos ovócitos é fundamental para permitir a reprogramação dos núcleos transferidos e para suportar o período inicial de desenvolvimento embrionário, sendo que as características avaliadas na seleção de ovócitos são a homogeneidade do citoplasma e um CP recém extruso (ALBERIO e ZAKHARTCHENKO, 2001), pois esse serve como ponto de referência para a localização da cromatina do ovócito.

As condições para a maturação são similares àquelas para a PIVE, ou seja, meio TCM 199 suplementado com hormônios e antibióticos, mantidos em temperatura de 38,5–39,0°C durante 16–24 h em atmosfera com umidade saturada contendo 5% de CO₂ em ar. Embora

meios de maturação sejam suplementados com outros fatores como estradiol, IGF-I e cisteamina, nenhuma diferença na produção de animais saudáveis tem sido verificada (KEEFER et al., 2001), sendo este protocolo também utilizado na EMBRAPA/CENARGEN.

3.4.2 Cultivo de células somáticas

Células da glândula mamária, células musculares, fibroblastos de pele de orelha, células do epitélio do oviduto, células do *cumulus*, células gonadais fetais, fibroblastos fetais, fibroblastos da mucosa oral, células de Sertoli e células neurais já foram utilizadas como doadoras de núcleo na técnica de TN (ZHOU et al., 2007), porém atualmente fibroblastos obtidos de biópsias de feto ou de animais adultos, da pele ou do músculo é o modelo celular mais utilizado (CHESNÉ, 2003), sendo que durante o estágio na EMBRAPA/CENARGEN foram utilizados fibroblastos de animais adultos. As células doadoras de núcleo podem ser usadas diretamente após a sua coleta do animal doador (GALLI et al., 1999) ou após um período de cultivo (KUBOTA et al., 2000). Quando a TN é realizada com células somáticas, uma solução de tripsina: EDTA é utilizada para separar as células, sendo acrescentado SFB para a inativação da mesma (BORDIGNON, 2008).

3.4.3 Enucleação e reconstrução de ovócitos

Quanto a enucleação, o protocolo mais utilizado continua sendo a microaspiração de uma porção do citoplasma com o auxílio de uma micropipeta. Para isso, os ovócitos são incubados com citocalasina B ou D, onde ambas possuem como função fazer uma

desestabilização reversível dos filamentos de actina, dando assim maior elasticidade aos ovócitos durante a micromanipulação e facilitando a manipulação (ALBERIO e ZAKHARTCHENKO, 2001; BORDIGNON, 2008). Durante a enucleação cerca de 20 a 30% do citoplasma é removido a fim de retirar a placa metafásica (BORDIGNON, 2008). Um fator importante é que após a extrusão do CP a placa metafásica migra para o centro do ovócito, portando quando a maturação estende às 24 horas, o CP não é um indicador eficiente da localização da cromatina (ALBERIO e ZAKHARTCHENKO, 2001). A retirada do CP e da cromatina, deve-se confirmar e para isso, utiliza-se fluorocromos que se ligam ao DNA, como o Hoesch 33342, o qual apresenta uma fluorescência em azul quando exposto à luz UV. Desta maneira, a remoção do material nuclear é confirmada pela ausência de fluorescência no ovócito após a enucleação. Contudo, estudos têm mostrado um efeito negativo da exposição do ovócito à luz UV (VELILLA et al., 2002). Conseqüentemente, tem sido recomendado não expor o citoplasma a esta radiação, mas sim apenas a porção removida presente na pipeta de aspiração (BORDIGNON, 2008). Para a enucleação, a EMBRAPA/CENARGEN utiliza micropipetas de aspiração para a remoção do CP e da cromatina. Além disso, se confirma a remoção com a utilização de Hoesch 33342.

Conforme Bordignon (2008) há outros protocolos para a enucleação sem o uso de fluorocromos. Um dos procedimentos consiste em realizar a enucleação algumas horas (1 a 3 horas) após a ativação do ovócito, no estágio de telófase II, pois nesta fase a cromatina encontra-se justaposta ao segundo CP garantindo que a maioria dos ovócitos seja enucleado com a remoção de uma pequena fração do citoplasma. Outro método para enucleação consiste em expor os ovócitos em MII após a retirada das células do *cumulus*, a um meio contendo demecolcina e sacarose por um período de 1 a 2 horas, esse tratamento promove uma pequena protrusão da membrana do ovócito onde se localiza a cromatina, sendo nesse protocolo os ovócitos enucleados antes da ativação, no estágio de MII (BORDIGNON, 2008).

Conforme Alberio e Zakhartchenko (2001), depois da enucleação, o material genético da célula doadora deve ser introduzido no ovócito enucleado, para isso a célula doadora deve ser inclusa no espaço perivitelino seguido pela fusão das mesmas, o método mais utilizado para a fusão em animais domésticos é o método de pulsos elétricos (eletrofusão). Porém pode ser induzida por outros métodos como, lipossomos e polietilenoglicol (BORDIGNON, 2008). A eletrofusão normalmente compreende um pulso de corrente alternada e um ou mais pulsos de corrente direta. A primeira serve para alinhar a célula doadora e o ovócito receptor em posição paralela aos eletrodos, já a segunda induz a formação de poros na membrana, o que

causa a fusão entre as células, sendo que a mesma deve ser realizada por meios de uma baixa condutância elétrica para evitar a produção e dispersão de calor, sendo utilizada uma solução de manitol (BORDIGNON, 2008). Conforme Heyman (2005), o pulso elétrico não somente induz a fusão da célula com o ovócito enucleado, mas também promove uma importante liberação de cálcio intracelular que inicia o processo de ativação (HEYMAN, 2005). Conforme Alberio e Zakhartchenko (2001), a eficiência da fusão depende dos parâmetros do sistema de eletrofusão como direção da corrente, duração, número e amplitude dos pulsos elétricos. Além disso, outros parâmetros não associados ao sistema de fusão também afetam a eficiência do protocolo como a idade do ovócito, integridade das membranas celulares e, contato entre as células e o diâmetro diferencial das células a ser fusionadas.

3.4.4 Ativação

A ativação é fundamental para dar início ao desenvolvimento embrionário. Além disso, o momento da ativação em relação ao momento da transferência nuclear pode afetar o processo de reprogramação dos núcleos transplantados (BORDIGNON, 2008). A ativação se refere a indução da degradação do complexo de proteínas denominado fator intracelular promotor da fase M (MPF), responsáveis por manter os ovócitos no estágio de MII (BORDIGNON, 2008). A ativação depende de várias ondas de liberação de cálcio no interior do ovócito, sendo que a mesma pode ser alcançada por pulsos elétricos curtos ou uma exposição rápida a substâncias químicas como a ionomicina, o 6-DMAP, o etanol, o cálcio ionóforo, o estrôncio e o cicloheximide, os quais regulam o influxo de cálcio no MPF, considerando que esses tratamentos podem ser utilizados sozinhos ou em conjunto, o que resulta em melhores resultados (NIEMANN e LUCAS-HAHN, 2012). Quando a ativação é ineficiente, os níveis de MPF são restabelecidos e conseqüentemente, a formação do pronúcleo, a síntese de DNA e a clivagem não ocorrem, podendo também ocorrer falhas no desenvolvimento embrionário mesmo após a implantação (BORDIGNON, 2008). Outra opção para garantir o sucesso da ativação dos ovócitos transplantados são a utilização de inibidores da síntese proteica (cicloexamida) ou inibidores das enzimas cinases (6-DMAP, roscovitina e butirolactona). A manutenção dos ovócitos por algumas horas nesses

inibidores evita que a atividade do MPF seja restabelecida e bloqueie o desenvolvimento embrionário. Em ruminantes, o uso de cálcio ionóforo seguido por um tratamento com inibidores da atividade de proteínas cinases, tal como a 6-DMAP ou por inibidores de proteínas cinases dependentes de ciclinas por três a seis horas, são os tratamentos mais realizados (SANSINENA et al., 2003) e utilizados na EMBRAPA/CENARGEN.

3.4.5 Cultivo *in vitro* de embriões

Após a fusão e a ativação, os embriões reconstruídos são cultivados *in vitro* até o estágio de blastocisto, sendo que apenas uma proporção dos embriões reconstituídos atinge esse estágio de desenvolvimento, e esta taxa é geralmente inferior em comparação a embriões PIV (YAMAZAKI, 2001). Em bovinos, as taxas de desenvolvimento dos embriões reconstituídos ainda durante o período de CIV tem-se mostrado bastante variáveis, desde inferiores a 5% até maiores que 65% de produção de blastocisto (WESTHUSIN et al., 2001). Esta ampla variação de resultados é reflexo dos diversos sistemas de CIV atualmente existentes. Os meios de cultivo utilizados para os embriões clones normalmente são iguais aos utilizados na PIVE, porém os embriões clones apresentam características distintas e provavelmente devem ter exigências metabólicas diferentes dos embriões PIV, sendo o meio ineficiente para o desenvolvimento embrionário. Além disso, normalmente no CIV de embriões clones utilizam-se sistemas de cocultivo utilizando células primárias do oviduto ou linhagens celulares estabelecidas (THOMPSON, 2000), como células do *cumulus*. Entretanto, Salamone et al. (2003) verificaram que embriões cultivados em SOF na ausência de cocultivo, porém numa atmosfera de três gases (5% de O₂, 5% de CO₂, 90% de N₂), apresentaram melhores taxas de clivagem e formação de blastocistos quando comparados àqueles tratados em sistemas de cocultivo. Na EMBRAPA/CENARGEN os embriões são cultivados por sete dias em meio SOFaaci e em cocultivo com células do *cumulus* e mantidos em estufa a 39°C, 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

4- CONCLUSÕES

As biotécnicas aplicadas à reprodução animal estão em ascensão no cenário nacional, e o conhecimento destas se faz fundamental para incrementar o rebanho nacional e permitir a competição do país no mercado internacional.

Após a realização do estágio supervisionado realizado na EMBRAPA/CENARGEN, pode-se afirmar que os objetivos e perspectivas foram superadas, pois durante este período foi possível acompanhar a execução das principais biotecnologias reprodutivas, tanto em laboratório quanto no campo, colocando assim em prática os conhecimentos adquiridos durante a formação acadêmica. Além disso, a convivência direta com pesquisa científica permitiu uma formação mais crítica na área, gerando um interesse ainda maior pela mesma e a certeza do caminho a ser seguido após a finalização do curso. Assim, o estágio proporcionou um crescimento acadêmico, profissional e pessoal como futura Médica Veterinária.

REFERÊNCIAS

- ABIEC, Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. **Rebanho Bovino Brasileiro**. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp>. Acesso em: 15 abril 2015.
- ADAMS, G.P. et al. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v.69, p.72-80, 2008.
- ADONA, P.R. et al. Embryonic development and gene expression in oocytes cultured *in vitro* in supplemented pre-maturation and maturation media. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 31-38, 2011.
- ALBERIO, R.; ZAKHARTCHENKO, V. Clonación de animales de interés zootécnico. In: PALMA, G.A. **Biotecnología de la Reproducción**. INTA: Buenos Aires, Argentina, 2001, p.353-382.
- ALI, J.; SHELTON, J.N. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 471-477, 1993.
- ANCHORDOGUY, T. J. et al. Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers. **Cryobiology**. v. 28, p. 467-73, 1991.
- BARROS, C.; NOGUEIRA, M. Superovulação em zebuínos de corte. In: BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO EM BOVINOS. SIMPÓSIO INTERNACIONAL DA REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1, 2004. Anais...Londrina, PR, 2004.
- BAUTISTTA, J.A.; KANAGAWA, H. Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. **The Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 45, p.183-191, 1998.

BETTERRIDGE, K.L. Procedures and results obtainable in cattle. In: **Current Therapy in Theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animals**.1980. p. 74-88.

BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.41 , p. 54-62, 1995.

BO, G.A.; MAPLETOFT,R.J. Evaluation and classification of bovine embryos. **Animal Reproduction**, v.10, n.3, p.344-348, 2013.

BONI, R.; et al. Intercellular communication in *in vivo* and *in vitro*-produced bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.61, n.4, p.1050-1055, 1999.

BORDIGNON, V. Clonagem Animal por Transferência Nuclear. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2^a ed. São Paulo:ROCA, 2008, p. 347-364.

BRACKETT, B.G. et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v.27, p.147-158, 1982

BRUM, D.S. et al. Cultivo individual de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.2, p.87-92, 2002.

CABODEVILA, J.; TERUEL, M. 2001. Criopreservación de embriones bovinos. In: PALMA,G.A. **Biotecnología de la reproducción**. INTA:Balcarse, Argentina, p.149-174.

CABODEVILA, J.; TORQUATI, S. Superovulação de fêmeas bovinas. In: PALMA, G.A. **Biotecnología de la reproducción**. 1^a Ed. INTA, Argentina, 2001. p.79-108.

CAIXETA, E. S.; DODE, M.A.N. Avaliações da competência ovocitária em bovinos. **Veterinária e Zootecnia**, v.17, n.1, p.8-18, 2010.

CAMPBELL, K.H.S. et al. Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. **Theriogenology**, v.68, p.214-231, 2007.

CAROLAN, C. et al. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology**, v.43, p.1115-1128, 1995.

CESARI, A. et al. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production *in vitro*. **Theriogenology**, v.66, p.1185-1193. 2006.

CHESNÉ, P. et al. Birth of live offspring from cultured transferred embryos in goats. In: SCIENTIFIC MEETING OF THE EUROPEAN EMBRYO TRANSFER ASSOCIATION, 2003, Rostock. Proceedings ... Rostock: AETE, 2003. p.144.

DIAS, L.P.B. et al. Concentração espermática e tempo de incubação na fecundação *in vitro* usando-se sêmen de touros da raça Guzerá. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p. 348-353. 2006.

DOBRINSKY, J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**, v.57, p.285-302, 2002.

DODE, M.A.N. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. In: ENCONTRO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 21, 2006, Araxá. Anais...Araxá: SBTE; 2006. p.115-129.

DODE, M.A.N. et al. The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of *Bos indicus* oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.69, p.15-23, 2002.

DODE, M.A.N.; LEME, L.O.; SPRICIGO, J.F.W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n.2, p.145-150, 2013.

EDWARDS, R.G. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. **Nature**, v.208, p.349-51, 1965.

ENRIGHT BP et al. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo*: implications for early embryo development and quality. **Theriogenology**, v.54, p.659-673, 2000.

ERICKSON, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science**, v.25, p.800-805, 1966.

FERNANDEZ, R.G. **Recoleccion no quirurgica de embriones**. Disponível em: <datateca.unad.edu.co/contenidos/203020/exe_203020/FIV/leccion_23_transferencia_embriionario_html>. Acesso em 11 de julho de 2014.

FERREIRA, A.R. **Efeitos da clonagem na inativação do cromossomo X e da regulação nutricional do metabolismo da metionina na qualidade ovocitária em bovinos**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2013.

FERREIRA, E.M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v.71, p.836-848, 2009.

FONSECA, J.F. et al. Superovulated zebu cows embryonic developmental stages. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.6, p. 671-676, 2001.

FOUNTAIN, D.M. et al. Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. **Transfusion**, v. 37, p. 585-591, 1997.

FRANCO, M.M.; MELO, E.O. **Melhoramento animal: o uso de marcadores moleculares e da reprodução assistida**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 14 p.

GALLI, C.; DUCHI, R.; MOOR, R.M. Mammalian leukocytes contain all the genetic information necessary for the development of a new individual. **Cloning**, v.1, p.161-170, 1999.

GARCIA, J.M.; AVELINO, K.B.; VANTINI, R. Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1, 2005, Londrina, Anais... Londrina, PR: UEL, 2005, 201p.

GEORGE, F. et al. Freezing of *in vitro* produced bovine embryos in animal protein-free medium containing vegetal peptones. **Theriogenology**, v.66, n.5., p.1381-1390, 2006.

GONÇALVES, P.B.D. et al. Produção *in vitro* de Embriões. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2ª ed. São Paulo:ROCA, 2008, p. 261-291.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. 2ªEd. Wallingford:CAB International. 2003. 548p.

HAFEZ, B.;HAFEZ,E.S.E. **Reprodução Animal**.7ª Ed. Barueri-SP:Manole,2004.

HENKEL, R.R; SCHILL, W.B. Sperm preparation for ART. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.14, p. 108, 2013.

HEYMAN, Y. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. **Reproduction, Nutrition, Development**, v.45, p.353- 361, 2005.

HOLM, P. et al. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine *in vitro* produced embryos in relation to their *in vitro* viability and sex. **Theriogenology**, v. 50, p. 1285-99, 1998.

HUANG, T.; KIMURA, Y.; YANAGIMACHI, R. The use of piezo micromanipulation for intracytoplasmic sperm injection of human oocytes. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 13, p. 320-328, 1999.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Demográfico 2010**. Disponível em: <<http://www.censo2010.ibge.gov.br>>. Acesso em: 15 abril 2015.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Séries Estatísticas e Séries Históricas**, Brasília:IBGE. Disponível em: <<http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?vcodigo=PPM01&sv=59&t=efetivo-rebanhos-tipo-rebanho>> . Acesso em: 23 jun. 2015.

INABA, Y. et al. In-straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using *Cryotop*. **Journal Reproductive and Development**, v.57, p.437-43, 2011.

KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 67-75, 1996.

KASAI, M.; MUKAIDA, T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. **Reproductive biomedicine online**. v. 9, p. 164-70, 2004.

KEEFER, C.L. et al. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. **Biology of Reproduction**, v.66, p.199- 203, 2001.

KUBOTA, C. et al. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.97, p.990-995, 2000.

KUWAYAMA, M. et al. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reproductive biomedicine online**, v. 11, p. 300-308, 2005

LANE, M.; SCHOOLCRAFT, W.B.; GARDNER, D.K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. **Fertility and Sterility**, v.72, p. 1073-1078, 1999.

LEIBO, S.P. Cryopreservation of oocytes and embryos: optimization by theoretical versus empirical analysis. **Theriogenology**. v. 69, p. 37-47, 2008.

LENZ, R.W. et al. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent process. **Biology of Reproduction**, v.29, p.173-179, 1983.

LONERGAN, P. A. Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocyst. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1096-1100, 2004.

LONERGAN, P.A. et al. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression – experience from animal studies. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 7, p. 657–663, 2003.

LU, K.H. et al. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. **Veterinary Record**, v.121, p. 259-260, 1987.

LUCCI, C. M. et al. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, v.57, p.1467-1483, 2002.

MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G.P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction, Nutrition, Development**, v.42, p.601-611, 2002.

MARQUEZ, M. et al. Principais estratégias para o incremento da TE em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p.161-164, 2008.

MARTINEZ, A.G. et al. Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos: *in vitro* and *in vivo* evaluations. **Animal Reproduction Science**, v.73, p.11-21, 2002.

MARTINEZ, A.G.; MATKOVIC, M. Cryopreservation of ovine embryos: Flow freezing and vitrification. **Theriogenology**, v. 49, p. 1039-1049, 1998.

MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S. P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of Reproduction**, v.54, p. 1059-1069, 1996.

MASSIP, A. Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reproduction in domestic animals**. v. 36, p. 49-55, 2001.

MATSUMOTO, H.; et al. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. **Cryobiology**. v. 42, p. 139-44, 2001.

MCKIERNAN, S.H.; BAVISTER, B.D. Different lots of bovine serum albumin inhibit or stimulate *in vitro* development of hamster embryos. In **Vitro Cellular and Developmental Biology**, v.28, p.154-156, 1992.

MEMILI, E.; FIRST, N.L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression compared with others species. **Zygote**, v.8, p.87-96, 2000.

MINGOTI, G.Z. **Maturação oocitária associada à esteroidogênese. Papel do soro sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteróides**. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2000, 135p.

MORATO, R. et al. Cryotops *versus* open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. **Cryobiology**, v.57, p. 137-141, 2008.

NAGANO, M.; KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, Y. Relationship between bovine oocyte morphology and *in vitro* developmental potential. **Zygote**, v.14,p.53-61,2006.

NEVES, J.P.; MIRANDA, K. L.; TORTORELLA, R.D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.414-421, 2010.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v.35, p.109-124, 1991.

NIEMANN, H.; LUCAS-HAHN, A. Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 2-10, 2012.

OLIVEIRA, E.B.; WATANABE, Y. F.; GARCIA, J. M. Establishment of IVF program for zebu cattle (*Bos Indicus*) in Brazil. **Theriogenology**, v. 41, p. 188, 1994.

PALMA, G.A. **Biotechnología de la Reproducción**. 1ª Ed. Balcare:Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. 2001. 701p.

PAPIS, K.; SHIMIZU, M.; IZAIKE, Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, v.54, p. 651-658, 2000.

PARRISH, J.J; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either *swim-up* or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, p. 859–869, 1995.

PEREIRA, A.F.; FREITAS, V.J.F. Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas atuais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, p.118-128, 2009.

PONTES, J.H. F. et al. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v.75, p.1640-1646, 2011.

RALL, W. F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**. v. 24, p. 387-402, 1987.

RALL, W. F.; FAHY, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. **Nature**. v. 313, p. 573-5, 1985.

REICHENBACH, H.D. et al. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2ª ed. São Paulo:Roca, 2008, p. 153-160.

RIEGER, R.; LOSKUTOFF, N.M.; BETERIDGE, K.J. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamina by cattle embryos produced and co-cultured *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95, p.585-505, 1992.

ROOVER, R. et al. *Ovum pick up* and *in vitro* embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. **Animal Reproduction Science**, v.86, p.13-25, 2005.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p. 229-233, 2007.

SALAMONE, D.F. et al. Effect of different culture systems, donor cell origin and roscovitin treatment of recipient oocytes in bovine cloning. **Theriogenology**, v.59, p.285, 2003.

SANSINENA, M.J. et al. Production of nuclear transfer llama (*Lama glama*) embryos from *in vitro* matured llama oocytes. **Cloning Stem Cells**, v.5, p.191-198, 2003.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**. v. 141, p. 1-19, 2011.

SARAGUSTY, J.; et al. Do physical forces contribute to cryodamage? **Biotechnology and bioengineering**. v. 104, p. 719-28, 2009.

SENEDA, M. M. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, n. 1, p. 101-110, 2002.

SIRARD, M.A. et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65,p.126-136,2006.

SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1241-1254, 2001.

SPRICIGO, J.F.W. **Vitrificação de ovócitos Bovinos em diferentes estádios da meiose pelo método de Cryotop:avaliação de danos morfológicos, funcionais e moleculares**. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais), Universidade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2012. 70 p.

STOJKOVIC, M. et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v.64, p.904-909, 2001.

STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D. **Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS)**. 4ªEd. Champaign,IL:IETS, 2010.

STROUD, B. IETS Statistics and Data Retrieval Committee Report. **International Embryo Transfer Society**, 2012.

TAKEDOMI, T. et al. Superovulation of Holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinilpirrolidone. **Theriogenology**, v. 43, n.7, p. 1259-1268, 1995.

THOMPSON, J.G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.263-275, 2000.

VAJTA, G. et al. *Open Pulled Straw* (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**. v. 51, p. 53-58, 1998.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.357-364, 2000.

VANDERZWALMEN, P. et al. Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing. **Human Reproduction**, v.18, p. 1504-1511, 2003.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.100-109, 2008.

VELLILLA, E. et al. Effect of Hoechst 33342 staining on developmental competence of prepubertal goat oocytes. **Zygote**, v.10, p.201-208, 2002.

VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S. Estatísticas da produção e transferência de embriões em 2013 e os novos rumos da indústria de embriões no Brasil. **O Embrião**. v.55, p. 16-18. 2015.

WESTHUSIN, M.E. et al. Cloning to reproduce desired genotypes. **Theriogenology**, v.55, p.35-49, 2001.

WOOD, M. et al. High rates of survival and fertilization of mouse and hamster oocytes after vitrification in dimethylsulphoxide. **Biology of reproduction**. v. 49, p. 489-95, 1993.

WU, B. et al. Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and *cumulus* cells during maturation *in vitro* of bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 560-565, 1996.

YAMAZAKI, W. **Clonagem em bovinos utilizando-se células somáticas de animais adultos: avaliação comparativa da reconstituição de citoplastos pelas técnicas de transferência nuclear e injeção nuclear intracitoplasmática**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001. 132f.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. **The physiology of reproduction**. 2.ed. New York: Raven, 1994. p.189-317.

ZEUNER, A. et al. Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v.59, p.1421- 1433, 2003.

ZHOU, H.; LIU, C.; WANG, W. Heterospecific nuclear-transferred embryos derived from equine fibroblast cells and enucleated bovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animal**, v.42, p.243-247, 2007.

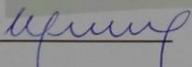
ZHOU, X.L. et al. Bovine oocyte vitrification using the *Cryotop* method: effect of *cumulus* cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. **Cryobiology**, v.61, p. 66-72, 2010.

ANEXO A- Certificado de Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária

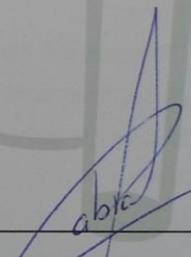
Certificado

Certificamos que **DANIELE MISSIO**, estudante do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pampa, realizou atividades como Estágio Curricular Supervisionado no Prédio da Biotecnologia da **EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA**, no período 23/02/2015 a 05/06/2015, cumprindo carga horária semanal de 40 horas, perfazendo um total de 600 Horas em atividades teóricas e práticas.

Brasília - DF, 05 de junho de 2015



Responsável SGP



Chefia-Geral

Embrapa
Recursos Genéticos e Biotecnologia